

DANIÉLA CRISTINA CALADO

POLIMORFISMOS EM *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 DETECTADOS ATRAVÉS DE
MARCADORES MOLECULARES (RAPD E RFLP) E COMPARAÇÃO COM *Anopheles*
bellator Dyar & Knab, 1906 E *Anopheles homunculus* Komp, 1937 (DIPTERA, CULICIDAE,
ANOPHELINAE)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, Área de Concentração em
Entomologia, do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Anice Mureb Sallum

CURITIBA

2005

DANIÉLA CRISTINA CALADO

POLIMORFISMOS EM *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 DETECTADOS ATRAVÉS DE
MARCADORES MOLECULARES (RAPD E RFLP) E COMPARAÇÃO COM *Anopheles*
bellator Dyar & Knab, 1906 E *Anopheles homunculus* Komp, 1937 (DIPTERA, CULICIDAE,
ANOPHELINAE)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Departamento de Zoologia - UFPR)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (IAPAR/ Londrina-PR)

Prof^a. Dr^a. Maria Anice Mureb Sallum (Departamento de Epidemiologia / FSP-USP)

Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho (Departamento de Zoologia - UFPR)

Prof^a. Dr^a. Ana Leuch Lozovei (Departamento de Patologia Básica - UFPR)

Prof. Dr. Rodrigo Torres (Departamento de Zoologia – UFPR)

Curitiba, abril de 2005

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Navarro pela orientação, paciência, amizade e constante incentivo.

À Prof. Dra. Maria Anice Mureb Sallum da Faculdade de Saúde Pública da USP, pelas sugestões.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões.

Aos coordenadores do curso de Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR, pela compreensão e pelas oportunidades.

Ao Pesquisador Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agronômico do Paraná (LBI) pela oportunidade de desenvolver parte da tese em seu laboratório e pelas valiosas sugestões.

Ao Pesquisador Dr. Luiz Pereira do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agronômico do Paraná (LBI) pelas sugestões.

Aos Professores Dr. Fábio Pedrosa e Dr. Emanuel de Souza do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pela oportunidade de desenvolver parte do trabalho no Laboratório de Fixação de Nitrogênio.

Ao pesquisador Dr. Alfredo Carvalho do Instituto Agronômico do Paraná pela iniciação nos trabalhos com PCR-RAPD, pelo incentivo e paciência.

Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) por permitir a captura de mosquitos na Reserva Biológica da Ilha do Mel.

Ao IAPAR por permitir as coletas na estação Experimental de Morretes.

À direção do IAPAR e à Ivone Rodrigues de Freitas do Centro de Difusão Tecnológica (CDT), pela hospitalidade e por permitir minha estada no alojamento durante a execução do trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e taxa de bancada.

À Prof. Dra. Adriana Lacerda, Departamento de Bioquímica da UFPR, pelas sugestões e pelo incentivo.

Às amigas Josiane T. Cardoso e Regina Célia Zonta de Carvalho pelas conversas, desabafos e incentivo nos momentos difíceis, e a Marisa Bortolanza e Larissa Borges pela amizade.

Ao “pessoal” do LBI: Alessandra, Bete, Giselly, Hugo, Ilara, Íris, Jane, Lucélia, Lúcia, Marcelo, Sandra, Tiago e Vanessa pela amizade, pelo agradável convívio e principalmente pela disponibilidade em ajudar (sempre!!).

Aos colegas do LEMV (Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária) da UFPR, em especial aos doutorandos Andreia Aparecida Barbosa (e seus pais) pelo auxílio nas coletas realizadas em Cananéia (Estado de São Paulo) e ao Eduardo Fumio Kuwabara pelo auxílio nas coletas em São Francisco do Sul (Estado de Santa Catarina). Aos demais colegas de laboratório, Ana Della Bona, Ana Tissot, Jonny Edward Luna Duque, Lisiane Poncio e Ricardo Vieira, pela convivência e amizade.

Aos meus pais pelo auxílio nas coletas realizadas em Morretes e Ilha do Mel, e principalmente pelo carinho e incentivo, sem os quais certamente não seria possível continuar acreditando.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS.....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Anopheles cruzii</i> . Aspectos taxonômicos e variabilidade morfológica.....	2
1.2 Distribuição geográfica.....	4
1.3 Aspectos bioecológicos.....	4
1.4 Importância médica.....	6
1.5 Caracterização citogenética, molecular e considerações sobre o complexo <i>Anopheles cruzii</i>	7
1.6 Utilização da PCR em estudos entomológicos.....	9
1.7 PCR-RAPD (<i>Polimerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA</i>).....	11
1.8 PCR-RFLP (<i>Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)..	13
1.9 Estrutura do DNA ribossômico (rDNA) e utilização em estudos entomológicos.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Locais de coleta, métodos de captura e manutenção em laboratório.....	18
3.2 Identificação das espécies coletadas e depósito de material <i>voucher</i>	19
3.3 Análise da variabilidade genética em <i>Anopheles cruzii</i> através de PCR-RAPD e comparação com outras espécies de <i>Kerteszia</i>	24
3.3.1 Análise da variabilidade genética entre indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> pertencentes a mesma progênie e comparação com <i>Anopheles bellator</i>	24
3.3.2 Análise da variabilidade genética dentro e entre populações de <i>Anopheles cruzii</i> e comparação com <i>Anopheles bellator</i>	25
3.3.3 Comparação entre os perfis obtidos para <i>Anopheles cruzii</i> , <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i> e possibilidade de utilização da técnica PCR-RAPD para identificação de <i>Anopheles cruzii</i> e <i>Anopheles homunculus</i>	25
3.3.4 Extração de DNA.....	26

3.3.5 Reação de amplificação (PCR-RAPD).....	27
3.3.6 Eletroforese.....	27
3.3.7 Análise dos resultados.....	28
3.4 Análise dos perfis de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> e comparação com <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i>	29
3.4.1 Amostras analisadas.....	29
3.4.2 PCR	30
3.4.3 Reação de restrição	31
3.4.4 Eletroforese.....	31
3.4.5 Análise dos resultados.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Polimorfismos em <i>Anopheles cruzii</i> detectados através de PCR-RAPD, e comparação com <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i>	33
4.1.1 Análise da variabilidade genética entre indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> pertencentes a mesma progênie e comparação com <i>Anopheles bellator</i>	35
4.1.2 Análise da variabilidade genética entre amostras de diferentes populações de <i>Anopheles cruzii</i>	49
4.1.3 Análise da variabilidade genética entre amostras de duas populações de <i>Anopheles bellator</i> e comparação com <i>Anopheles cruzii</i>	64
4.1.4 Comparação entre os perfis obtidos para <i>Anopheles cruzii</i> , <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i> e possibilidade de utilização da técnica PCR-RAPD para identificação de <i>Anopheles cruzii</i> e <i>Anopheles homunculus</i>	77
4.2 Análise da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S através de PCR-RFLP.....	88
4.2.1 Análise do perfis de restrição da região ITS2 e parte dos genes 28S e 5.8S de <i>Anopheles cruzii</i>	88
4.2.2 Comparação entre os perfis de restrição da região ITS2 e parte dos genes 28S e 5.8S de <i>Anopheles cruzii</i> , <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i>	104
5.CONCLUSÕES.....	112
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

8. APÊNDICE.....	136
------------------	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Áreas de coleta, data e número de exemplares de <i>Anopheles (Kerteszia)</i> capturados, durante o período de maio de 2001 a novembro de 2003.....	23
Tabela II. Número de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> e <i>Anopheles bellator</i> de cada progênie, analisados através de RAPD-PCR.....	24
Tabela III. Espécies, locais de coleta e número de indivíduos de <i>Anopheles</i> spp. analisados através de PCR-RAPD.....	25
Tabela IV. Espécies, locais de coleta e número de indivíduos de <i>Anopheles (Kerteszia)</i> spp. analisados através de PCR-RFPL.....	29
Tabela V. Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles (Keterszia)</i> spp.....	30
Tabela VI. Endonucleases utilizadas para restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i>	32
Tabela VII. Seqüências e conteúdo GC (%) dos iniciadores utilizados na reação de PCR-RAPD.....	34
Tabela VIII. Fragmentos mais freqüentes em amostras de <i>Anopheles cruzii</i> coletadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, amplificados através de PCR-RAPD.....	49
Tabela IX. Análise da variância molecular (AMOVA) entre e dentro de populações de <i>Anopheles cruzii</i>	53
Tabela X. Identidade e Distância genética entre amostras de <i>Anopheles cruzii</i> coletadas em Morretes, Paranaguá+Guaratuba (P+G), São Paulo e Santa Catarina.....	54
Tabela XI. Fragmentos mais freqüentes entre amostras de <i>Anopheles bellator</i> coletadas em Cananéia e Paranaguá, amplificados através de PCR-RAPD.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da unidade de repetição do rDNA.....	16
Figura 2. Aspecto geral dos locais de coleta. Ilha do Mel (Município de Paranaguá, Estado do Paraná). A: criadouros de <i>Anopheles (Kerteszia)</i> spp. B: área de restinga. C: Morro da Fortaleza.....	20
Figura 3. Aspecto geral dos locais de coleta. A: Estação Experimental do IAPAR (Morretes, Estado do Paraná). B e C Propriedade particular (São Francisco do Sul, Estado de Santa Catarina).....	21
Figura 4. Aspecto geral dos locais de coleta. A e B: Município de Cananéia, Estado de São Paulo.....	22
Figura 5. Seqüência da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> (Município de Juquiá - Estado de São Paulo) (Mallafronte <i>et al.</i> , 1997 - número de acesso AF035227) contendo os sítios de restrição das endonucleases: <i>Bst</i> UI, <i>Sau</i> 96I, <i>Hae</i> III, <i>Hha</i> I, <i>Hinf</i> I, <i>Hinc</i> II, <i>Nru</i> I e <i>Taq</i> I. Regiões sublinhadas correspondem aos genes 5.8S e 28S.....	32
Figura 6. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de mesma progênie, obtidos com o iniciador OPY-15. <i>Anopheles cruzii</i> (a, b, c) e <i>Anopheles bellator</i> (g, k). (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	38
Figura 7. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPA-11. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	39
Figura 8. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> de mesma progênie (g, h, i, j, k), obtidos com o iniciador OPA-11. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	40
Figura 9. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de mesma progênie de <i>Anopheles cruzii</i> (a, b, c) e <i>Anopheles bellator</i> (g, k) obtidos com o iniciador OPY-16. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	41
Figura 10. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPY-05. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	42
Figura 11. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPY-10. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	43

Figura 12. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> de mesma progênie (g, h, i, j, k), obtidos com o iniciador OPY-10. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	44
Figura 13. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPY-02. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	45
Figura 14. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> de mesma progênie (g, h, i, j, k), obtidos com o iniciador OPY-02. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen).....	46
Figura 15. Dendrograma obtido a partir de fragmentos gerados pela PCR-RAPD, utilizando o método de agrupamento UPGMA e coeficiente de similaridade de Jaccard, em indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> . m. Morretes, i. Ilha do Mel, p. Paranaguá, g. Guaratuba, s. São Francisco do Sul, c. Cananéia, f. Florianópolis.....	52
Figura 16. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPY-05. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen);(A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	55
Figura 17. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPY-16. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	56
Figura 18. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPY-02. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	57
Figura 19. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPY-10. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	58
Figura 20. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPA-11. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	59
Figura 21. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPA-01. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	60
Figura 22. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> , obtidos com o iniciador OPY-15. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen);(A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.....	61

Figura 23. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPG-03. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	66
Figura 24. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPY-05. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	67
Figura 25. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPA-11. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	68
Figura 26. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPY-10. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	69
Figura 27. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPY-15. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	70
Figura 28. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPA-01. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	71
Figura 29. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPY-16. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	72
Figura 30. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> , obtidos com o iniciador OPY-02. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.....	73
Figura 31. Dendrograma obtido a partir de fragmentos gerados pela PCR-RAPD, utilizando o método de agrupamento UPGMA e coeficiente de similaridade de Jaccard, em indivíduos de <i>Anopheles bellator</i> de Cananéia (Estado de São Paulo) (c) e Paranaguá (Ilha do Mel, Estado do Paraná) (i).....	74
Figura 32. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (c) e <i>Anopheles homunculus</i> (h), obtidos com os iniciadores: (A) OPY-05; (B) OPY-10; (C) OPY-02; (D) OPA-11; (E) OPY-15; (F) OPY-16 e (G) OPA-01. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Seta indicam marcadores (somente em iniciadores passíveis de serem utilizados para identificação específica - ver texto).....	78

Figura 33. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (1-10) e <i>Anopheles bellator</i> (11-20), obtidos com o iniciador OPY-02. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.....	79
Figura 34. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (1-9) e <i>Anopheles bellator</i> (10-19), obtidos com o iniciador OPY-05. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.....	80
Figura 35. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (1-9) e <i>Anopheles bellator</i> (10-19), obtidos com o iniciador OPY-16. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.....	81
Figura 36. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (1-10) e <i>Anopheles bellator</i> (11-19), obtidos com o iniciador OPA-11. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.....	82
Figura 37. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (1-10) e <i>Anopheles bellator</i> (11-20), obtidos com o iniciador OPY-10. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.....	83
Figura 38. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de <i>Anopheles cruzii</i> (1-10) e <i>Anopheles bellator</i> (11-18), obtidos com o iniciador OPA-01. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.....	84
Figura 39. Dendrograma construído a partir das bandas mais freqüentes entre amostras de <i>Anopheles cruzii</i> , <i>Anopheles bellator</i> e <i>Anopheles homunculus</i> , obtidas através da técnica PCR-RAPD. Agrupamento através do método UPGMA e utilizando distância de NEI (1972).....	85
Figura 40. Produto de amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> . (M) Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen), (C) Controle negativo.....	87
Figura 41. Polimorfismos na sequência da região ITS2 de <i>Anopheles cruzii</i> . 1. São Francisco do Sul e Paranaguá (este trabalho), Juquiazinho (Município de Jucitaba) (AF035227) e Peruíbe (AF027165) [MALLAFRONT <i>et al.</i> , 1997].....	89

Figura 42. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com <i>Sau96I</i> . (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).....	94
Figura 43. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>NruI</i> . (M) marcador 123pb DNA Ladder (Invitrogen).....	95
Figura 44. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>HaeIII</i> . (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	96
Figura 45. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>Hinfl</i> . (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	97
Figura 46. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>HhaI</i> . (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	98
Figura 47. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>TaqI</i> . (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).....	99

Figura 48. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>HincII</i> . (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).....	100
Figura 49. A. Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> , estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). B. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> com a endonuclease <i>BstUI</i> . (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).....	101
Figura 50. Produto de amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles bellator</i> (1), <i>Anopheles cruzii</i> (2) e <i>Anopheles homunculus</i> (3). (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).....	106
Figura 51. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles homunculus</i> (1-2), <i>Anopheles cruzii</i> (3-4) e <i>Anopheles bellator</i> (5-7) com <i>Sau96I</i> . (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).....	106
Figura 52. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S com <i>HaeIII</i> e <i>NruI</i> . <i>Anopheles cruzii</i> (1), <i>Anopheles bellator</i> (2) e <i>Anopheles homunculus</i> (3). (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	107
Figura 53. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S com <i>TaqI</i> . <i>Anopheles cruzii</i> (1-2), <i>Anopheles bellator</i> (3-5) e <i>Anopheles homunculus</i> (6). (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	107
Figura 54. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S (A) com <i>HinfI</i> . <i>Anopheles cruzii</i> (1), <i>Anopheles homunculus</i> (2), <i>Anopheles bellator</i> (3). (B) com <i>HhaI</i> . <i>Anopheles homunculus</i> (1) e <i>Anopheles cruzii</i> (2). (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).....	108
Figura 55. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S com <i>HincII</i> . <i>Anopheles cruzii</i> (1), <i>Anopheles bellator</i> (2- 4), <i>Anopheles homunculus</i> (5). (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).....	109
Figura 56. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de <i>Anopheles cruzii</i> (1-3), <i>Anopheles bellator</i> (4-6) e <i>Anopheles homunculus</i> (7) com <i>BstUI</i> . (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).....	109

LISTA DE SIGLAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (<i>Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado</i>)
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (<i>Análise da Variância Molecular</i>)
AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed PCR</i> (PCR com Iniciadores Arbitrários)
AS-PCR	Allele-specific PCR (<i>PCR alelo-específica</i>)
dNTP	dideoxiribonucleosídeo trifosfato
DNA	<i>ácido desoxiribonucléico</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
ETS	External Transcribed Spacer (<i>Espaçador Externo Transcrito</i>)
HDA	Heteroduplex Analysis
ITS	Internal Transcribed Spacer (<i>Espaçador Interno Transcrito</i>)
IGS	Intergenic Spacer (<i>Espaçador Intergênico</i>)
mtDNA	DNA mitocondrial
NTS	Non Transcribed Spacer (<i>Espaçador Não Transcrito</i>)
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
PCR	Polymerase Chain Reaction (<i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (<i>DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso</i>)
rDNA	DNA ribossômico
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (<i>Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição</i>)
RNA	<i>Ácido ribonucléico</i>
rRNA	<i>RNA ribossômico</i>
SCARs	Sequence Characterized Amplified Region (<i>Região Amplificada Caracterizada por Seqüência</i>)
SSCP	Single-Stranded Conformational Polymorphism (<i>Polimorfismo Conformacional de Simples Fita</i>)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
TFPGA	Tools for Populations Genetics Analyses
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

LISTA DE SÍMBOLOS

A	adenina
C	citossina
cm	centímetro
°C	graus Celsius
Cl	cloro
G	guanina
g	grama
H	hidrogênio
kpb	kilo pares de bases
l	litro
Mg	magnésio
ml	mililitro
mg	miligrama
μg	micrograma (1μg =10 ⁻⁶ g)
Na	sódio
ng	nanograma (1ng =10 ⁻⁹ g)
pg	picograma (1pg =10 ⁻¹² g)
pb	pares de bases
T	timina
U	unidade enzimática

RESUMO

Anopheles cruzii é considerado vetor primário de *Plasmodium* nos litorais sul e sudeste brasileiro. Variações morfológicas, comportamentais e cromossômicas têm sido observadas nesse táxon, sugerindo a existência de pelo menos três espécies crípticas. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética e verificar a possibilidade de detectar espécies crípticas em populações de *Anopheles cruzii* do sul do Brasil, utilizando as técnicas PCR-RAPD e PCR-RFLP. As análises foram realizadas a partir de adultos da geração F1 de fêmeas coletadas nos estados de Santa Catarina (Florianópolis e São Francisco do Sul), Paraná (Morretes, Paranaguá e Guaratuba) e São Paulo (Cananéia). Através da técnica PCR-RAPD, sete iniciadores foram utilizados para comparação entre indivíduos de mesma progênie, de mesma população e de populações diferentes de *Anopheles cruzii*. Os perfis de restrição da região ITS2 e parte do genes 5.8S e 28S foram obtidos com as enzimas *Bst*UI, *Hae*III, *Taq*I, *Hha*I, *Sau*96I, *Hin*fI, *Hinc*II e *Nru*I. Exemplos de *Anopheles bellator* (Cananéia) e *Anopheles homunculus* (São Francisco do Sul) foram incluídos nas análises. Através da técnica PCR-RAPD, grande número de bandas polimórficas foram detectadas em *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator*. As distâncias genéticas entre as populações de *Anopheles cruzii* variaram de 0,0214 a 0,0673 e as identidades genéticas foram altas (9,350-9,788), sugerindo que as amostras representam uma única espécie. O número de migrantes por geração foi de 4,3, indicando a existência de fluxo gênico entre as populações. Todos os indivíduos identificados como *Anopheles cruzii* apresentaram bandas comuns que não foram compartilhadas por *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* e que podem ser utilizadas como marcadores específicos. Os polimorfismos observados em *Anopheles cruzii* podem representar variações intraespecíficas, pois também foram observados entre indivíduos de mesma progênie. Os padrões de restrição da região ITS2 foram semelhantes para todas as amostras de *Anopheles cruzii*, entretanto, os resultados obtidos com *Hha*I indicam que os indivíduos analisados apresentam seqüências diferentes daquelas disponíveis no GenBank. As informações aqui obtidas indicam, ainda que, marcadores RAPD e RFLP podem ser utilizados para identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*.

Palavras-chave: variabilidade genética, complexo de espécies, ITS2, PCR-RAPD, PCR-RFLP, *Anopheles* (*Kerteszia*).

ABSTRACT

Anopheles cruzii is considered a primary vector of *Plasmodium* in the Brazilian and southeast litoral. Morphological, behaviour and cromossomal variations have been observed in this taxon, and these variations suggested the existence of at least three species. The aim of this work was to analyse the genetic variability and to find out the possibility of the existence of cryptic species in populations of *Anopheles cruzii* in southern Brazil. These analysis were carried out using PCR-RAPD and PCR-RFLP. Adults of F1 generation of females collected in Santa Catarina (Florianópolis and São Francisco do Sul), Paraná (Morretes, Paranaguá e Guaratuba) and São Paulo (Cananéia) states were uses in this study. Trough PCR-RAPD, seven primers were used to compare individuals of progeny, same population and different populations of *Anopheles cruzii*. The restriction profiles from ITS2 region, including fragments of 5.8S and 28S genes, were obtained using the enzymes *Bst*UI, *Hae*III, *Taq*I, *Hha*I, *Sau*96I, *Hin*fl, *Hinc*II and *Nru*I. *Anopheles bellator* (Cananéia) and *Anopheles homunculus* (São Francisco do Sul) were included in the analyses. Using PCR-RAPD, many polymorphics bands were detected in *Anopheles cruzii* and *Anopheles bellator*. Genetic distances among populations of *Anopheles cruzii* varied from 0.0214 until 0.0673 and the genetic identities were high (9.350-9.788), suggesting that the samples belong to the same specie. The migrant number per generation was 4.3, indicating the existence of genetic flow among *Anopheles cruzii* populations. All individuals of *Anopheles cruzii* showed bands that were not present in *Anopheles bellator* and *Anopheles homunculus*, which can be used as specie specific markers. The polymorphism found in *Anopheles cruzii* may represent intraspecific variation, because they were also observed among individuals of the same progeny. The restriction profiles of the ITS2 region were similar for all *Anopheles cruzii* samples. However, the results generated from *Hha*I indicate that the individuals analysed showed different sequences when compared with those that are in GenBank. The results obtained in this study showed that RAPD and RFLP markers can be used to identify *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*.

Key words: genetic variability, species complex, ITS2, PCR-RAPD, PCR-RFLP, *Anopheles (Kerteszia)*.

POLIMORFISMOS EM *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 DETECTADOS ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES (RAPD E RFLP) E COMPARAÇÃO COM *Anopheles bellator* Dyar & Knab, 1906 E *Anopheles homunculus* Komp, 1937 (DIPTERA, CULICIDAE, ANOPHELINAE)

INTRODUÇÃO

O gênero *Anopheles* Meigen compreende aproximadamente 400 espécies, distribuídas em quatro subgêneros: *Anopheles* Meigen, *Kerteszia* Theobald, *Nyssorhynchus* Blanchard e *Cellia* Theobald (SALLUM *et al.*, 2000). No Brasil, *Nyssorhynchus* é responsável, principalmente, pela manutenção da malária na região Amazônica, enquanto *Kerteszia* destaca-se pela transmissão de plasmódio em áreas recobertas pela Floresta Atlântica.

Segundo CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2003), o interesse pela melhor caracterização morfológica, pela análise da variabilidade genética e por comparações intrapopulacionais de espécies de anofelinos neotropicais tem aumentado durante os últimos anos, porém a maioria dos estudos refere-se às espécies de *Nyssorhynchus*. Estudos envolvendo marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA têm sido realizados, por exemplo, em: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (MANGUIN *et al.*, 1999 e CONN *et al.*, 1999), complexo *Anopheles (N.) albitarsis* (WILKERSON *et al.*, 1995a, b), complexo *Anopheles (N.) oswaldoi* (MARRELLI *et al.*, 1999) e *Anopheles (N.) nuneztovari* Gabaldón (POSSO *et al.*, 2003; SCARPASSA *et al.*, 2000). Apesar da importância epidemiológica, os dados disponíveis a respeito de *Kerteszia* são insuficientes, provavelmente devido a dificuldade de manutenção das espécies sob condições de laboratório e porque em muitas áreas, o número de mosquitos capturados é pequeno (CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003). Assim, pouco é conhecido a respeito da variabilidade genética de populações e espécies desse subgênero.

Kerteszia inclui 12 espécies: *Anopheles auyantepuiensis* Harbach & Navarro, *Anopheles boliviensis* (Theobald) *Anopheles gonzalezrinconesi* Cova García, Pulido & Escalante de Ugueto, *Anopheles lepidotus* Zavortink, *Anopheles pholidotus* Zavortink, *Anopheles rollai* Cova García, Pulido & Escalante de Ugueto, *Anopheles homunculus* Komp, *Anopheles neivai* Howard, Dyar & Knab, *Anopheles laneanus* Corrêa & Cerqueira, *Anopheles bambusicolus* Komp, *Anopheles cruzii* Dyar & Knab e *Anopheles bellator* Dyar & Knab. As seis últimas possuem registros de ocorrência em território brasileiro, e dentre as quais, *Anopheles cruzii* destaca-se por ser considerado vetor primário de *Plasmodium* nas regiões sul e sudeste do Brasil.

1. 1 *Anopheles cruzii*. Aspectos taxonômicos e variabilidade morfológica

Anopheles cruzii foi descrito por Theobald em 1909, sob o nome *Anopheles lutzii*, a partir de exemplares coletados no município do Rio de Janeiro (Estado do Rio de Janeiro). Porém, o nome *Anopheles cruzii* foi designado posteriormente por DYAR & KNAB (1908), tendo em vista que *Anopheles lutzii* já encontrava-se pré-ocupado por *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *lutzii* Cruz.

As fêmeas dessa espécie são morfológicamente semelhantes as de *Anopheles homunculus* (FORATTINI, 1962; MARTINS, 1958; ZAVORTINK, 1973 e WILKERSON & PEYTON, 1991) e a diferenciação específica entre elas, nem sempre é fácil, tendo em vista o alto grau de variabilidade observada nos caracteres morfológicos diferenciais. Além disso, as formas adulta (fêmea) e imaturas de *Anopheles cruzii* também assemelham-se as de *Anopheles laneanus*, e a distinção entre estas espécies é feita através da genitália masculina (FORATTINI, 1962).

Segundo WILKERSON & PEYTON (1991) as fêmeas de *Anopheles cruzii* diferenciam-se de *Anopheles homunculus* pelos caracteres presentes nos palpos maxilares. Em *Anopheles*

homunculus, o terceiro segmento do palpo maxilar apresenta escamas moderadamente a levemente eretas, enquanto as do quarto segmento são levemente eretas a decumbentes; o palpo maxilar apresenta escamas brancas no ápice do 3, 4 e 5 palpômeros, ou somente no quarto, ou ainda se as escamas claras estiverem presentes em mais de um segmento são maiores no quarto palpômero. Em *Anopheles cruzii*, os palpos maxilares apresentam escamas decumbentes no terceiro e quarto palpômeros, sendo algumas vezes levemente eretas na base do terceiro; as escamas claras estão presentes nos palpômeros 3-5, sendo a mancha do terceiro igual ou maior a do quinto. Segundo WILKERSON & PEYTON (1991), os caracteres presentes nos palpos são de difícil interpretação. E portanto, a identificação específica segura somente é alcançada através da análise da genitália masculina.

Além de considerar os caracteres presentes nos palpos maxilares como diagnósticos, MARTINS (1958) aponta ainda que as fêmeas de *Anopheles cruzii* apresentam tegumento abdominal de coloração vermelha uniforme ou vermelha com áreas claras; enquanto *Anopheles homunculus* possui tegumento com manchas escuras e claras, mas nunca avermelhadas.

As larvas de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* também são muito semelhantes morfologicamente, mas segundo LIMA (1952) podem ser diferenciadas pela coloração do tegumento e grau de quitinização do segmento anal. Em *Anopheles cruzii*, o segmento anal é pouco quitinizado e o tegumento apresenta coloração amarelada ou avermelhada. Enquanto, as larvas de *Anopheles homunculus* apresentam segmento anal muito quitinizado e tegumento de coloração escura.

Além da semelhança com *Anopheles homunculus*, variações morfológicas têm sido observadas em *Anopheles cruzii*, suscitando dúvidas no momento da identificação. COUTINHO *et al.* (1943) verificaram que exemplares de *Anopheles cruzii* coletados em Paranaguá (Estado do Paraná), embora semelhantes aos encontrados no restante do Brasil, diferem um pouco do material descrito por KOMP (1937). Estes autores observaram que as manchas claras na veia Costa são sempre variáveis nessa espécie.

Diferenças morfológicas entre larvas de *Anopheles cruzii* foram observadas por ZAVORTINK (1973) em populações dos estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina, sugerindo a possibilidade de existência de outra espécie.

1. 2 Distribuição geográfica

Muitos registros quanto à ocorrência de *Anopheles cruzii* são duvidosos e possivelmente estão relacionados à outras espécies do subgênero *Kerteszia*. ZAVORTINK (1973) aponta uma vasta área de distribuição, que inclui a Venezuela, Peru, Panamá, Guianas, Equador, Costa Rica, Colômbia, Brasil, Bolívia e Argentina. Entretanto, WILKERSON & PEYTON (1991) e FORATTINI (1962) restringem essa distribuição ao território brasileiro, abrangendo aos estados de Pernambuco (?), Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

1. 3 Aspectos bioecológicos

As fêmeas de *Anopheles cruzii* podem exercer a hematofagia durante o dia (COUTINHO *et al.*, 1943), mas picam principalmente durante os crepúsculos matutino e vespertino e nas primeiras horas da noite. Apresenta ritmo paracrepuscular, com um segundo pico de atividade ocorrendo imediatamente após aquele verificado dentro do período crepuscular propriamente dito (FORATTINI *et al.*, 1986a,b).

É exofílica, apresentando maior frequência dentro da mata (GUIMARÃES *et al.*, 2000), mas em algumas áreas pode adentrar o domicílio em grande número. As fêmeas freqüentam o ambiente antrópico para realização do repasto sanguíneo, porém logo após realizá-lo, abandonam o ambiente à procura de abrigo no meio natural circundante (FORATTINI *et al.*, 2000; CONSOLIM *et al.*, 1979). Pode ser considerada eclética quanto a

escolha de hospedeiros, alimentando-se do homem, outros mamíferos e aves (DEANE, 1986).

Anopheles cruzii move-se do dossel para o solo e vice-versa, porém apresenta distintos graus de acrodendrofilia em diferentes regiões do Brasil, levantando suspeitas quanto ao *status* taxonômico de algumas populações. Na Floresta da Cantareira (Estado de São Paulo) é acrodendrófila, enquanto em Joinville (Estado de Santa Catarina), é eclética, alimentando-se próximo ao solo e em diferentes níveis da floresta (DEANE, 1992; DEANE *et al.*, 1984).

Informações quanto a duração do ciclo biológico sob condições naturais são escassas, e poucos estudos sob condições de laboratório foram realizados. Em ambiente natural, o período de desenvolvimento de espécies de *Kerteszia* é longo, ARAGÃO (1968a) aponta que os imaturos procedentes de posturas de verão não completam o desenvolvimento em menos de quatro meses. Em condições de laboratório, WILKERSON & PEYTON (1991) verificaram que a duração da fase de ovo ao adulto é de aproximadamente 35 dias.

Não há dados referentes a longevidade de adultos na natureza. Fêmeas capturadas em campo e posteriormente mantidas em laboratório podem sobreviver por mais 31 dias em condições não controladas (LUZ *et al.*, 1977). A sobrevivência pode ser superior a dois meses sob 25°C e umidade entre 60-90% (observação pessoal).

Em condições de laboratório, o número de ovos por postura é bastante variável, mas a maioria das fêmeas (58%) deposita até 50 ovos (RACHOU, 1950). Em campo, pequeno número de larvas tem sido observado em cada criadouro (FORATTINI *et al.*, 1961), sugerindo que as fêmeas depositam poucos ovos, possivelmente para evitar competição por recursos.

Os imaturos desenvolvem-se nas axilas foliares de bromélias terrestres ou epífitas (ZAVORTINK, 1973), podendo ocorrer associada a outras espécies de *Kerteszia*, como *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* (VELOSO *et al.*, 1956). Diferenças comportamentais quanto a utilização desses criadouros foram verificadas nos municípios de Guaratuba (Estado do Paraná) e Brusque (Estado de Santa Catarina) e segundo ARAGÃO

(1968b) podem sugerir a existência de duas entidades biológicas difíceis de serem distinguidas pelos caracteres morfológicos. Nessas localidades, *Anopheles cruzii* apresenta duas alturas preferenciais quanto a ocupação das bromélias, uma próxima ao solo e outra correspondente a copa das árvores.

Imaturos de *Anopheles cruzii* já foram encontrados em criadouros artificiais no município de Paranaguá (Estado do Paraná) (LUZ *et al.*, 1987), e em poças pluvias, valas e remanso de rio no município de Brusque (Estado de Santa Catarina) (RACHOU & FERREIRA, 1966a), porém sua ocorrência nesses tipos de criadouros pode ser considerada acidental.

1. 4 Importância médica

Anopheles cruzii é considerado vetor primário de *Plasmodium* spp. nos litorais sul e sudeste brasileiro, principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, tendo sido várias vezes encontrado infectado por oocistos e esporozoítos (COUTINHO *et al.*, 1943; AMARAL, 1942; RACHOU & FERREIRA, 1966b). Está envolvido com a manutenção de malária oligossintomática que ocorre em áreas de Mata Atlântica no estado de São Paulo e Rio de Janeiro (CARVALHO *et al.*, 1998, BRANQUINHO *et al.*, 1997).

BRANQUINHO *et al.* (1997) ao analisarem amostras dos municípios de Jquitiba e São Vicente (Estado de São Paulo) verificaram infecção de *Anopheles cruzii* por *Plasmodium* *vixax* clássico, *Plasmodium vivax* VK247 e por *Plasmodium brasilianum-malariae*. Segundo esses autores, embora os índices de infecção encontrados tenham sido baixos (0,149% para *P. vixax* clássico e 0.086% para *P. vivax* VK247) a alta densidade de mosquitos e sua voracidade podem compensar a baixa porcentagem de espécimes infectados.

Além da malária humana, *Anopheles cruzii* é vetor de *Plasmodium simium* Fonseca e *Plasmodium brasilianum* Gonder & Von Berenberg-Gossler, agentes causadores de malária simiana (DEANE, 1992).

1.5 Caracterização citogenética, molecular e considerações sobre o complexo *Anopheles cruzii*

Anopheles cruzii apresenta cariótipo $2n=6$, típico do gênero *Anopheles*, onde o par maior é submetacêntrico, o médio metacêntrico e o menor acrocêntrico e heteromórfico nos machos (RAMIREZ *et al.*, 1994). Comparada a outras espécies do gênero, *Anopheles cruzii* apresenta elevado grau de polimorfismo genético, expresso no grande número de inversões cromossômicas. RAMIREZ & DESSEN (2000a,b) reconheceram três padrões de bandas em cromossomos politênicos de diferentes populações dos litorais dos estados de São Paulo e Santa Catarina, e sugerem a existência de pelo menos três espécies crípticas, designadas provisoriamente por *Anopheles cruzii* A, B e C. Desde a descoberta desses arranjos cromossômicos, outras ferramentas têm sido utilizadas no estudo das populações de *Anopheles cruzii*.

MALLAFRONTÉ *et al.* (1997) verificaram diferenças quanto a seqüência e ao padrão de restrição da região ITS2 (*Second Internal Transcribed Spacer*) em amostras de cinco localidades do estado de São Paulo, mas não fizeram inferências quanto ao significado desses polimorfismos.

Diferentes padrões isoenzimáticos foram observados em populações de *Anopheles cruzii* e corroboram a hipótese de existência de um complexo de espécies. CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) analisando os perfis enzimáticos de diferentes populações, verificaram que exemplares coletados no Estado da Bahia diferem de amostras obtidas nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina, e podem constituir uma população isolada ou uma espécie distinta.

A evolução de populações de mosquitos em espécies isoladas pode ser sutil e não acompanhada por mudanças na morfologia externa, gerando grupos de espécies crípticas (BEEBE *et al.*, 2002). Segundo LAMBERT (1983) a semelhança morfológica entre as espécies de *Anopheles* pode ser resultado do sistema de reconhecimento entre indivíduos machos e

fêmeas. Muitas espécies de *Anopheles*, durante o processo de reprodução, formam enxames e o reconhecimento entre indivíduos parece ser parcialmente mediado pela frequência de vibração das asas. Desta forma, caracteres morfológicos podem ter pouca ou nenhuma contribuição durante o processo de reprodução (PATERSON, 1980).

Apesar de serem indistinguíveis ou semelhantes morfológicamente, as espécies crípticas apresentam muitas vezes características biológicas distintas decorrentes de diferenças genéticas. Desta forma, as primeiras evidências quanto a existência de diferentes espécies dentro de um táxon, surgem geralmente a partir da constatação de variações comportamentais e ecológicas, que são posteriormente confirmadas com a utilização de estudos citogenéticos e/ou moleculares. Essas diferenças biológicas podem estar relacionadas a preferência por determinado hospedeiro, taxa de infecção, ciclo de hematofagia, resistência a inseticidas e hábitos de repouso (MNZAVA *et al.*, 1995; WHITE, 1982; COLUZZI *et al.*, 1979), e apresentam importantes implicações epidemiológicas e para o controle da malária. Um dos exemplos mais estudados é o complexo *gambiae*, o qual é constituído por sete espécies (*Anopheles merus* Doenitz, *Anopheles melas* Theobald, *Anopheles bwambae* White, *Anopheles arabiensis* Patton, *Anopheles quadriannulatus* Theobald, *Anopheles quadriannulatus* B e *Anopheles gambiae* Giles), mas apenas *Anopheles gambiae* s.s. e *Anopheles arabiensis* são considerados importantes vetores de *Plasmodium* no continente africano (WHITE, 1974).

Várias espécies de *Anopheles* integram grupos ou complexos de espécies, tais como: complexo *maculipennis* (WHITE, 1978), complexo *dirus* (PEYTON & RAMALIGAM, 1988; PEYTON, 1989), complexo *gambiae* (WHITE, 1985), complexo *minimus* (GREEN *et al.*, 1990), complexo *fluviatilis* (SARALA *et al.*, 1994), complexo *albitarsis* (KREUTZER *et al.*, 1976; ROSA-FREITAS *et al.*, 1990; WILKERSON *et al.*, 1995a) e complexo *oswaldoi* (MARRELLI *et al.*, 1999). E o número de vetores membros de complexos tem aumentado a medida que novas populações são estudadas, sugerindo que grande parte da literatura científica descrevendo

aspectos ecológicos dos vetores e seu envolvimento na transmissão de *Plasmodium* estejam um tanto comprometidos (COLLINS *et al.*, 2000).

Espécies crípticas podem ocorrer em simpatria, o que adiciona um maior grau de dificuldade aos estudos. O não conhecimento de que a amostra de uma população contém uma mistura de espécies, aumenta as dificuldades em definir se as variações encontradas são relacionadas a uma espécie polimórfica ou a um grupo de espécies bastante próximas. Indivíduos coletados em uma área particular podem ser uma mistura de várias espécies e portanto não podem ser analisados como uma única população a ser comparada com populações de outras localidades, sem antes assegurar que os indivíduos são constituintes de um mesmo táxon (WILKERSON, 1995a). Conseqüentemente, a elucidação do *status* específico, de barreiras reprodutivas e a identificação de populações intraespecíficas é vital para qualquer estudo de vetores de doenças (BEEBE *et al.*, 2002).

A caracterização de populações de *Anopheles* através de caracteres morfológicos, citogenéticos, moleculares e ecológicos, além de elucidar questões taxonômicas, assume importante papel no entendimento das relações parasita-vetor-homem, gerando informações importantes a serem utilizadas em programas e estratégias de controle da malária.

1. 6 Utilização da PCR em estudos entomológicos

A aplicação de ferramentas da Biologia Molecular tem permitido o entendimento de diversos aspectos relacionados direta ou indiretamente com o material genético dos insetos. E dentre os culicídeos, o gênero *Anopheles* têm recebido especial atenção, possivelmente pela capacidade de transmitir *Plasmodium* (agente causador da malária) e pela ocorrência de espécies crípticas, motivando a obtenção de grande número de informações a respeito de espécies desse gênero.

As técnicas de estudo do DNA diferem substancialmente quanto a complexidade (trabalho), quantidade de amostra necessária, custo, tipo de informação gerada e aplicabilidade. Na subfamília Anophelinae, diversas técnicas têm sido aplicadas visando, por exemplo: a identificação de espécies (FANELLO *et al.*, 2002; HACKETT *et al.*, 2000; SCOTT *et al.*, 1993; GARROS *et al.*, 2004; WILKERSON *et al.*, 1993), estudo da estrutura genética de populações (WALTON *et al.*, 2001; POSSO *et al.*, 2003; SIMARD *et al.*, 1999), detecção de híbridos (TEMU *et al.*, 1997), reconstrução de propostas filogenéticas (SALLUM *et al.*, 2002; SHARPE *et al.*, 2000) e seqüenciamento completo de genomas (HOLT *et al.*, 2002).

Dentre as técnicas de estudo do DNA, a PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) foi a de maior impacto em estudos entomológicos. Esta baseia-se na amplificação *in vitro* de moléculas de DNA, utilizando dois iniciadores (MULLIS & FALOONA, 1987) e uma DNA polimerase termoestável (SAIKI *et al.*, 1988). Os iniciadores apresentam normalmente 18-30pb, possuem a extremidade 3'-OH livre e são complementares às seqüências flanqueadoras do segmento alvo (BOWDITCH *et al.*, 1993), permitindo o início da amplificação da seqüência de DNA pela enzima DNA polimerase.

Um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Pela sensibilidade e especificidade, a PCR tem encontrado grande aplicabilidade em estudos entomológicos e parasitológicos (taxonômicos e filogenéticos), incluindo aqueles com aplicações mais práticas (diagnósticos). O advento da PCR tornou possível o estudo de espécimes incompletos ou danificados que são difíceis de serem identificados morfológicamente, exemplares depositados em museus, espécies de pequeno porte e insetos fossilizados (OTRANTO & STEVENS, 2002).

Apesar de pouca quantidade de DNA ser utilizada, a amplificação via PCR requer conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse. Por isso, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida, a PCR

apresentou de início, um uso limitado como técnica para obtenção de marcadores moleculares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

A partir do desenvolvimento da PCR, outras metodologias tem sido desenvolvidas ou utilizadas em conjunto. Dentre as técnicas mais empregadas no estudo de espécies e populações vetorais, destacam-se: PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), PCR-AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites ou STR (Short Tandem Repeat), SSCP (*Single-strand Conformation Polymorphism*), AS-PCR (*Allele-specific PCR*) e o sequenciamento de genomas inteiros, de genes e regiões específicas do genoma.

1.7 PCR-RAPD (*Polimerase Chain Reaction - Random Amplified Polymorphic DNA*)

Utilizando o princípio da PCR, WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH & MCCLELLAND (1990) desenvolveram simultaneamente as técnicas PCR-RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) e PCR-AP (PCR com Iniciadores Arbitrários), respectivamente, que dispensam o conhecimento prévio sobre a sequência a ser amplificada.

A PCR-RAPD é uma variação da PCR que baseia-se na amplificação do DNA, através da utilização de um único oligonucleotídeo curto com sequência arbitrária e baixa temperatura de anelamento (35-36°C/baixa estringência). Estas duas modificações diminuem a especificidade da reação de maneira que fragmentos de sequência anônima possam ser amplificados (BOWDITCH *et al.*, 1993; WILLIAMS *et al.*, 1990). Embora os iniciadores apresentem sequência arbitrária, devem conter em torno de 10 pares de bases, conteúdo GC de 50-70% e não devem conter sequências palindrômicas, para evitar o autopareamento (WILLIAMS *et al.*, 1993). Alterações em fatores como temperatura de anelamento, concentração do iniciador, tamanho e sequência do iniciador, concentração de magnésio e quantidade de DNA podem alterar o padrão de bandas RAPD amplificados

(WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1993). Isto exige que as condições experimentais sejam otimizadas para materiais distintos, e que estas sejam rigorosamente seguidas.

A AP-PCR é similar a PCR-RAPD, porém faz uso de iniciadores mais longos. Além disso, utiliza ciclos de baixa estringência (anelamento a 40°C) seguidos por ciclos de alta estringência (anelamento a 60°C) (WELSH & MCCLELLAND, 1990).

A maioria dos marcadores RAPD comportam-se como marcadores genéticos dominantes (BOWDITCH *et al.*, 1993). Dominância nesse caso não se refere ao conceito clássico de interação gênica entre alelos de um mesmo loco, e sim puramente do ponto de vista de interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo. Ao se observar uma banda RAPD, não é possível distinguir se aquele segmento originou-se a partir de uma ou duas cópias da sequência amplificada. Ou seja, um indivíduo diplóide homozigoto para aquele loco RAPD possui dois “alelos” RAPD idênticos (AA) a partir dos quais a amplificação ocorre. Por outro lado, um indivíduo heterozigoto (Aa) para o mesmo loco RAPD possui um “alelo” (A) que é amplificado e o outro (a) que não o é (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A PCR-RAPD não permite a diferenciação entre indivíduos “homozigotos dominantes” e “heterozigotos”, somente a presença ou ausência da banda RAPD pode ser detectada (WILLIAMS *et al.*, 1993).

A técnica PCR-RAPD tem sido empregada com sucesso em diferentes grupos de insetos e com diferentes objetivos, como por exemplo: a) para identificação de espécies de: *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae) (SKODA *et al.*, 2002), *Triatoma* (Laporte) (Hemiptera: Reduviidae) (BRENIÈRE *et al.*, 2003), *Culicoides* (Latreille) (Diptera: Ceratopogonidae) (SEBASTIANI *et al.*, 2001; RAICH *et al.*, 1993), *Anopheles* (WILKERSON *et al.*, 1995ab; LOUNIBOS *et al.*, 1998; RUTLEDGE *et al.*, 1999), de subespécies de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) (BALLINGER-CRABTREE *et al.*, 1992) e de larvas de insetos necrófagos (BENECKE, 1998); b) caracterização da estrutura e variabilidade genética de populações de: *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) (SOUZA *et al.*, 2004),

parasitóides (EDWARDS & HOY, 1993), *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) (MANGUIM *et al.*, 1999), *Aedes aegypti* (APOSTOL *et al.*, 1996), *Tomicus piniperda* (Linnaeus) (Coleoptera: Scolytidae) (CARTER *et al.*, 1996), *Ceratitis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae) (HAYMER & MCINNIS, 1994) e de biótipos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (MOYA *et al.*, 2001); c) inferir introdução (única ou múltipla) e origem geográfica de espécies introduzidas (FONSECA *et al.*, 2001).

Além disso, marcadores obtidos através de iniciadores de sequência arbitrária (RAPD) têm sido convertidos em marcadores de sequência específica ou SCARs (*"Sequence Characterized Amplified Region"* - Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequência) e utilizados para identificação de espécies, por exemplo, do complexo *Anopheles sudaicus* (DUSFOUR *et al.*, 2004).

1.8 PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

A PCR-RFLP é uma adaptação do RFLP que envolve a amplificação de genes ou regiões específicas do genoma via PCR e posterior clivagem com endonucleases, gerando polimorfismos quanto ao peso molecular, dispensando o uso de reagentes radioativos.

Cada enzima de restrição possui um sítio específico de reconhecimento, onde é realizada a clivagem. Geralmente, essas sequências são simétricas e possuem 4 a 6 pares de bases. A substituição de bases ou pequenos eventos de *"indel"* podem criar ou eliminar sítios de restrição em uma determinada sequência para uma enzima particular, alterando dessa forma, o número de fragmentos gerados e seu tamanho (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001). A escolha das enzimas de restrição a serem utilizadas pode ser realizada pela digestão dos produtos de PCR com um grande número de enzimas ou através da análise da sequência do gene ou região de interesse. As enzimas utilizadas devem clivar pelos menos

uma vez o DNA de cada espécie estudada, para evitar dúvidas quanto ao sucesso da reação de restrição (WALTON *et al.*, 1999).

Em estudos entomológicos, a PCR-RFLP tem sido utilizada para estudo do DNA mitocondrial e ribossômico visando, principalmente, a identificação de espécies (BEEBE *et al.*, 2000; OTRANTO *et al.*, 2000; VAN BORTEL *et al.*, 2000; FANELLO *et al.*, 2002; VAN BORTEL *et al.*, 2002 e GARROS *et al.*, 2004).

1.9 Estrutura do DNA ribossômico (rDNA) e utilização em estudos entomológicos

O rDNA é uma família multigênica, que está presente no genoma dos insetos em grande número de cópias, aproximadamente 700 cópias (por genoma) em fêmeas de *Anopheles gambiae* (COLLINS *et al.*, 1989). Algumas espécies de *Anopheles* têm um único “locus rDNA” localizado no cromossomo X (COLLINS *et al.*, 1987), entretanto, em *Anopheles merus*, *Anopheles melas* e *Anopheles quadriannulatus* estas cópias estão ligadas a outros cromossomos (COLLINS *et al.*, 1989).

Esta família gênica evolui de forma coesiva dentro da espécie através do mecanismo de “evolução em concerto” (“*concerted evolution*”) ou “evolução coincidente”, o qual tende a homogeneizar as seqüências dentro da espécie, enquanto dirige a diferenciação entre espécies. Quando esse processo ocorre de forma efetiva, todas as cópias possuem a mesma seqüência (BROWER & DESALLE, 1994). Atualmente, acredita-se que a homogeneização de genes e família gênicas possa ser resultado dos processos de “*crossing over*” desigual, conversão gênica, deslizamento das fitas de DNA durante a replicação e amplificação (LIAO, 1999 *apud* NAHUM, 2000).

As várias cópias do rDNA estão dispostas em séries, constituídas de três regiões codificantes (18S, 5.8S e 28S), separadas por duas regiões transcritas (ITS1 e ITS2) que são descartadas durante o processamento. Cada unidade básica é separada por uma região

não transcrita, denominada sequência espaçadora intergênica (IGS - “*Intergenic Spacer*”), que é hipervariável (Figura 1).

Na família Culicidae, os genes 18S, 5.8S e 28S têm sido utilizados para reconstrução de propostas filogenéticas, enquanto as regiões espaçadoras têm sido mais comumente empregadas para solucionar questões taxonômicas ou para análise genética de populações (SCOTT *et al.*, 1993; MERIDA *et al.*, 1995; HACKETT *et al.*, 2000; RENO *et al.*, 2000; BEEBE *et al.*, 2001; KRZYWINSKI *et al.*, 2001; KOEKEMOER *et al.*, 2002 e SALLUM *et al.*, 2002).

Os espaçadores evoluem mais rápido que as regiões codificantes, pois as substituições que ocorrem nessas regiões não afetam diretamente a síntese de proteínas (HWANG & KIM, 1999). Desta forma, os dois espaçadores internos (ITS1 e ITS2), que são flanqueados por regiões conservadas, podem ser amplificados via PCR utilizando iniciadores que anelam-se às extremidades dos genes 18S, 5.8S e 28S (COLLINS & PASKEWITZ, 1996; WESSON *et al.*, 1992). As regiões ITS1 e IGS não têm sido tão estudadas quanto o ITS2 devido ao tamanho, à presença de unidades repetitivas e aos polimorfismos intraindividuais (BEEBE & COOPER, 2000; BEEBE *et al.*, 2002; PASKEWITZ *et al.*, 1993; SHARPE *et al.*, 2000).

Polimorfismos na região ITS2 de *Anopheles* têm sido investigados, principalmente, através da técnica de seqüenciamento, RFLP, SSCP, PCR-RFLP e HDA (*Heteroduplex analysis*) (PASKEWITZ *et al.*, 1993; KOEKEMOER *et al.*, 1999; HACKETT *et al.*, 2000; ROMI *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2000 e VAN BORTEL *et al.*, 2002). Além disso, o seqüenciamento da região ITS2 de *Anopheles* tem permitido o desenho de iniciadores espécie-específicos para amplificação conjunta (*multiplex*) (WALTON *et al.*, 1999; PHUC *et al.*, 2003; KENGNE *et al.*, 2003), possibilitando a identificação mais rápida, precisa e com menor custo. Iniciadores específicos também têm sido construídos a partir das outras regiões do rDNA (FAVIA *et al.*, 2001).

COLLINS & PASKEWITZ (1996) apresentam uma revisão a respeito da utilização do rDNA para identificação de espécies crípticas de *Anopheles*.

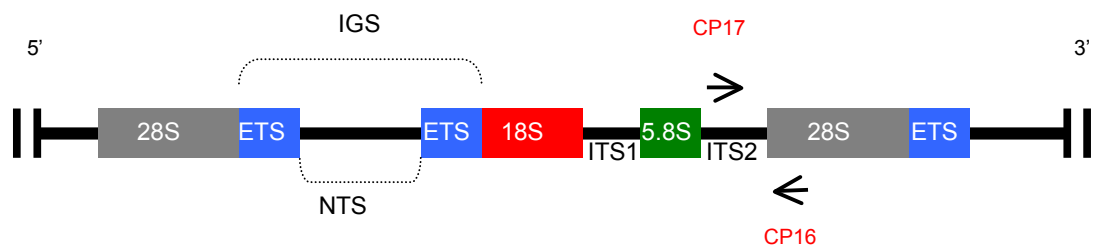


Figura 1 . Esquema da unidade de repetição do rDNA.

ETS: espaçador externo;

ITS: espaçador interno;

28S: região que codifica para rRNA28S;

NTS: espaçador não transcrito;

18S: região que codifica para rRNA 18S;

5.8S: região que codifica para 5.8S;

IGS: espaçador intergênico;

CP17 e CP16: iniciadores (ver materiais e métodos).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância epidemiológica, a variabilidade morfológica, cromossômica, molecular e comportamental, e a possibilidade de *Anopheles cruzii* compreender um complexo de espécies, este trabalho teve como objetivo: analisar a similaridade e variabilidade genética entre amostras de *Anopheles cruzii* coletadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, utilizando as técnicas PCR-RAPD e PCR-RFLP. Teve como objetivos específicos:

- analisar, através de PCR-RAPD, a variabilidade genética entre indivíduos de *Anopheles cruzii* pertencentes a uma mesma progênie;
- determinar se existem polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição na sequência que compreende a região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*;
- comparar os resultados obtidos através de PCR-RFLP com as seqüências disponíveis no GenBank;
- verificar a existência de mais de uma espécie entre as amostras de *Anopheles cruzii* das populações coletadas;
- comparar os dados obtidos para *Anopheles cruzii* com aqueles observados para outras espécies do subgênero *Kerteszia* (*Anopheles homunculus* e *Anopheles bellator*);
- verificar a possibilidade de identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* através de marcadores RAPD e RFLP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta, métodos de captura e manutenção em laboratório

As capturas de anofelíneos adultos foram realizadas em áreas de Floresta Atlântica, no período de maio de 2001 a novembro de 2003, utilizando a técnica de pouso-homem. Fêmeas de *Anopheles (Kerteszia)* spp. foram capturadas durante os períodos crepusculares e noturno, exceto para os exemplares procedentes de Paranaguá, cuja coleta foi efetuada entre 10:00 e 12:00 horas. Na tabela I estão indicadas as localidades, número de exemplares e datas das coletas. Vistas parciais de algumas das áreas de coleta podem ser verificadas nas figuras 2-4.

No Estado do Paraná, as coletas foram realizadas na Estação Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná situada no Município de Morretes (48°49'W, 25°30'S); no município de Guaratuba (propriedade particular); no Parque Estadual do Palmito (25°35'S, 48°32'W) e na Estação Ecológica da Ilha do Mel, Município de Paranaguá (25°30'36.0''S, 48°18'44.7''W). Em Santa Catarina, foram realizadas no município de São Francisco do Sul (26°14'03.4''S, 48°41'09.3''W - propriedade particular, área de preservação permanente) e em Florianópolis no Parque Desterro da Universidade Federal de Santa Catarina (27°47', 48°34' - margem da rodovia SC-401). Em São Paulo, as coletas foram realizadas no município de Cananéia (24°53'26.5''S, 47°50'16.5''W).

As fêmeas capturadas foram individualizadas em frascos de polietileno transparente (3,5cm de diâmetro X 7,5cm de altura), para obtenção da geração F1 e posterior identificação. No interior de cada frasco foi colocado algodão embebido em água e coberto com papel filtro, para obtenção de ovos. Para alimentação açucarada foi fornecido algodão embebido em solução de mel a 10% e o repasto sangüíneo foi realizado em hospedeiro

humano. As fêmeas foram mantidas em câmara climatizada (modelo 347 marca FANEM) sob fotoperíodo CE:12/12h, temperatura de 25°C e umidade relativa de 60-90%.

As posturas foram mantidas em recipientes contendo 40ml de água de torneira sem cloro e com 0,28g/l de NaCl [Biotech], cujas bordas internas foram revestidas por papel filtro para evitar a adesão dos ovos às paredes, impedindo a dessecação dos mesmos. A partir da eclosão, as larvas foram transferidas para recipientes com capacidade para 120ml, contendo 100ml de água e ração para peixe marca TetraMin®, triturada e pulverizada sobre a água. A limpeza dos recipientes contendo os imaturos foi realizada a cada dois dias, momento no qual foram substituídos o meio líquido e o alimento. Ao atingirem o quarto estágio, parte das larvas foi individualizada para obtenção das exúvias larval e pupal, as quais foram montadas entre lâmina e lâmina. O restante do material foi mantido até a obtenção de adultos, os quais foram sacrificados por congelamento e armazenados em etanol absoluto [Merck] a -20°C, para serem utilizados nas análises moleculares.

3.2 Identificação das espécies coletadas e depósito de material *voucher*

Os trabalhos de KOMP (1937), FORATTINI (1962), ZAVORTINK (1973) e WILKERSON & PEYTON (1991) foram utilizados para a identificação morfológica do material coletado. Parte dos insetos coletados e aqueles obtidos em laboratório foram depositados na coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure (DZUP), do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

O material depositado constitui-se de lâminas permanentes contendo as exúvias larval e pupal, adultos machos e fêmeas em via seca e lâminas contendo a genitália masculina. Foram depositados exemplares pertencentes às espécies *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* foram depositados.

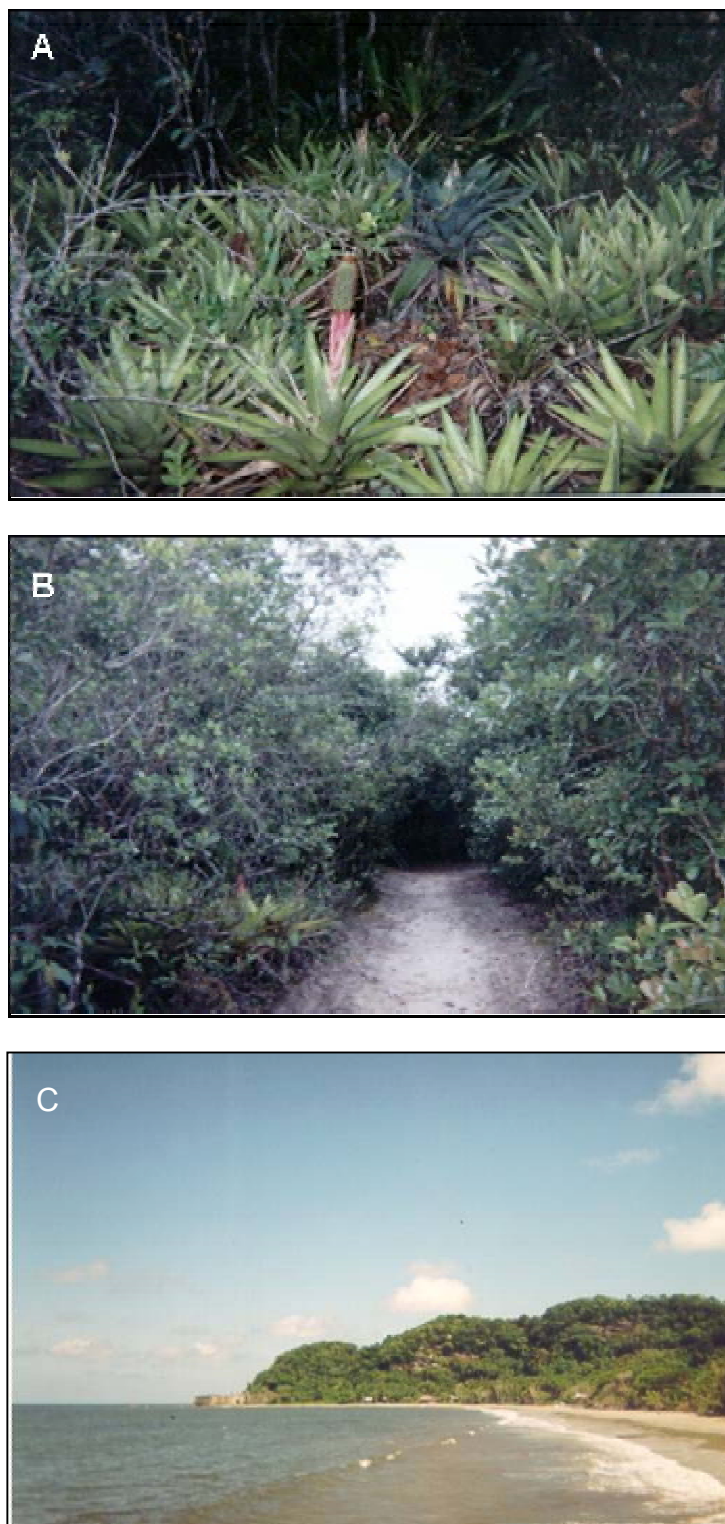


Figura 2. Aspecto geral dos locais de coleta. Estação Ecológica da Ilha do Mel (Município de Paranaguá, Estado do Paraná). **A:** criadouros de *Anopheles (Kerteszia)* spp. **B:** área de restinga. **C:** Morro da Fortaleza.

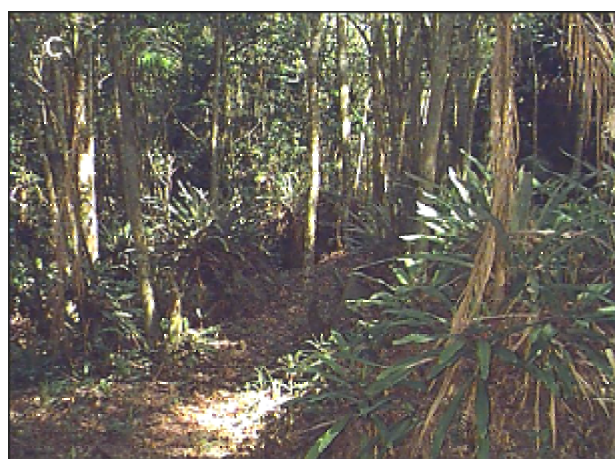


Figura 3. Aspecto geral dos locais de coleta. **A**: Estação Experimental do IAPAR (Morretes, Estado do Paraná). **B e C** Propriedade particular, área de preservação permanente (São Francisco do Sul, Estado de Santa Catarina).



Figura 4. Aspecto geral dos locais de coleta. **A** e **B**: Município de Cananéia, Estado de São Paulo.

Tabela I. Áreas de coleta, data e número de exemplares de *Anopheles (Kerteszia) spp.* capturados, durante o período de maio de 2001 a novembro de 2003.

	Estado	Localidade	Data de coleta	Espécies	N. exemplares
1.	PR	MORRETES	09.05.2001	AC*	79
2.	PR	MORRETES	04.07.2001	AC	01
3.	PR	MORRETES	18.08.2001	AC	01
4.	PR	MORRETES	03.09.2001	AC	00
5.	SC	SÃO FRANCISCO DO SUL	10.09.2001	AC	03
6.	PR	MORRETES	24.10.2001	AC	00
7.	PR	MORRETES	14.11.2001	AC	01
8.	PR	MORRETES	18.12.2001	AC	192
9.	SC	SÃO FRANCISCO DO SUL	10.02.2002	AC e AH*	06
10.	SC	FLORIANÓPOLIS	22.02.2002	AC	03
11.	PR	PARANAGUÁ/ILHA DO MEL	02.03.2002	AC e AB*	67
12.	SP	CANANÉIA	09.03.2002	AC e AB	58
13.	SC	SÃO FRANCISCO DO SUL	13.03.2002	AC	44
14.	SC	FLORIANÓPOLIS	11.04.2002	AC	07
15.	PR	PARANAGUÁ/ILHA DO MEL	25.04.2002	AC e AB	173
16.	PR	MORRETES	11.10.2002	AC	90
17.	SC	SÃO FRANCISCO DO SUL	09.11.2002	AC	20
18.	SC	SÃO FRANCISCO DO SUL	10.01.2003	AC	383
19.	PR	MORRETES	17.01.2003	AC	18
20.	PR	MORRETES	02.02.2003	AC	24
21.	PR	MORRETES	03.02.2003	AC	12
22.	SP	CANANÉIA	09.02.2003	AC e AB	328
23.	PR	PARANAGUÁ/ILHA DO MEL	18.02.2003	AC e AB	21
24.	PR	MORRETES	25.02.2003	AC	79
25.	PR	PARANAGUÁ/P. DO PALMITO	05.11.2003	AC	84
26.	PR	PARANAGUÁ/P. DO PALMITO	19.11.2003	AC	17
27.	PR	GUARATUBA	03.11.2003	AC	10

*AC *Anopheles cruzii*, AB *Anopheles bellator* e AH *Anopheles homunculus*.

3.3 Análise da variabilidade genética em *Anopheles cruzii* através de PCR-RAPD e comparação com outras espécies de *Kerteszia*

O estudo da variabilidade genética em *Anopheles cruzii* foi realizado a partir de comparações: a) entre indivíduos de mesma progênie, b) entre indivíduos da mesma e de diferentes populações c) e com outras espécies de *Kerteszia* (*Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*).

3.3.1 Análise da variabilidade genética entre indivíduos de *Anopheles cruzii* pertencentes a mesma progênie e comparação com *Anopheles bellator*

Indivíduos irmãos obtidos em laboratório (item 3.1) foram utilizados nesse experimento, sendo as progênies escolhidas ao acaso. O número de descendentes analisados foi diferente para cada fêmea, tendo em vista a dificuldade de manutenção e obtenção de posturas em laboratório. A comparação entre amostras de *Anopheles cruzii* foi realizada a partir de 41 indivíduos pertencentes a seis progênies diferentes (A-F). Nesse experimento, também foram utilizados exemplares de *Anopheles bellator*. Para essa espécie, foram analisados 36 indivíduos das progênies G-L (Tabela II).

Tabela II. Número de indivíduos de *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator* de cada progênie, analisados através de RAPD-PCR.

<i>Anopheles cruzii</i>		<i>Anopheles bellator</i>	
Progênies	N	Progênies	N
A	8	G	15
B	9	H	3
C	5	I	3
D	5	J	4
E	5	K	7
F	9	L	4
Total	41	Total	36

3.3.2 Análise da variabilidade genética dentro e entre populações de *Anopheles cruzii* e comparação com *Anopheles bellator*

Nesse experimento, as análises foram conduzidas no sentido de comparar a variabilidade existente dentro e entre populações de *Anopheles cruzii* utilizando indivíduos adultos (machos e fêmeas) obtidos em laboratório. Para efeito de comparação, duas populações de *Anopheles bellator* foram analisadas. O número de exemplares utilizados e as localidades amostradas encontram-se na Tabela III.

3.3.3 Comparação entre os perfis obtidos para *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* e possibilidade de utilização da técnica PCR-RAPD para identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*

Para investigar a possibilidade de identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* através da técnica PCR-RAPD, foram utilizadas as mesmas amostras descritas na Tabela III.

Tabela III. Espécies, locais de coleta e número de indivíduos de *Anopheles* spp. analisados através de PCR-RAPD.

Espécie	Estado	Localidade	Número de exemplares
<i>Anopheles cruzii</i>	Santa Catarina	São Francisco do Sul	39
		Florianópolis	03
	Paraná	Guaratuba	02
		Morretes	41
		Paranaguá*	16
<i>Anopheles bellator</i>	São Paulo	Cananéia	38
	Paraná	Paranaguá (Ilha do Mel)	25
	São Paulo	Cananéia	26
<i>Anopheles homunculus</i>	Santa Catarina	São Francisco do Sul	02
Total de indivíduos analisados			192

* Ilha do Mel e Parque Estadual do Palmito

3. 3.4 Extração de DNA

Para evitar riscos de contaminação das amostras com DNA de parasitas ou com sangue de hospedeiros, foram utilizados apenas indivíduos adultos (machos e fêmeas) obtidos em laboratório e que não receberam nenhum tipo de alimento.

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo de CHEUNG *et al.* (1993) modificado por CARVALHO & VIEIRA (2001). Exemplares adultos foram macerados individualmente em tubo de microcentrífuga de 1.5ml, contendo 200µl de tampão de lise (200mM Tris-HCl pH 8, 2M NaCl e 70mM EDTA) e 50µl de 5% Sarcosyl.

A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 65°C, sendo em seguida centrifugada por 15 minutos a 10000rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml e foram adicionados 250µl de isopropanol gelado e 110µl de 10M acetato de amônio. A solução foi homogeneizada por inversão e mantida “overnight” em freezer –20°C, para precipitação do DNA. Após 15 minutos de centrifugação a 10000rpm, o sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado duas vezes com 300µl de etanol 70% e secado sob temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 100µl de TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA) contendo RNase (10µg/ml) e armazenado a –20°C.

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% e a concentração determinada em espectrofotômetro Genesys™ 8 Spectronic Unicam. As extrações tiveram rendimento médio de 2,5µg de DNA por amostra, com variação de 0,5-5µg.

3.3.5 Reação de amplificação (PCR-RAPD)

A reação de amplificação foi conduzida em volume total de 25µl, contendo 0,6-1,2ng/µl de DNA genômico, 1X PCR buffer, 3mM de MgCl₂, 100µM de cada dNTP, 5pmol de iniciador (Operon Technologies Inc. Alameda, CA.), 1U de *Taq* DNA polimerase [Invitrogen] e água Milli-Q estéril para completar o volume final. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100™ [MJ Research, Inc. Watertown, MA], utilizando-se os seguintes ciclos de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 41 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 35°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos, e extensão final a 72°C por quatro minutos. Cada reação foi repetida 1 a 2 vezes para confirmação da posição e reprodutibilidade das bandas. Controles negativos foram incluídos.

Cento e quarenta e três iniciadores das séries OPA, OPB, OPC, OPD, OPG, OPH, OPM, OPN, OPX, OPY foram previamente testados em uma amostra de *Anopheles cruzii* para verificar quais seriam passíveis de amplificação. As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se no Apêndice I.

3.3.6 Eletroforese

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1,5% contendo 0,5X TBE, a 5V/cm durante 3 horas e corados com solução de brometo de etídio (0,5-1µg/ml) por 20-30 minutos. Como marcador de peso molecular foi utilizado 100pb DNA Ladder (Invitrogen). A captura das imagens (sob luz ultravioleta) e o cálculo do peso molecular aproximado das bandas foram realizados com auxílio do sistema KODAK Digital Science EDAS 120. As imagens foram apresentadas na forma de negativo para melhor visualização das bandas.

3.3.7 Análise dos resultados

Como para cada loco RAPD, duas variantes genéticas são detectadas, presença ou ausência da banda, os perfis eletroforéticos, obtidos nas análises entre indivíduos de mesma progênie e entre populações, foram comparados visualmente para construção de matriz binária indicando a presença (1) ou ausência da banda (0) em uma dada posição ou peso molecular.

A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o coeficiente de JACCARD (1908):

$$S_{xy} = a / (a+b+c),$$

onde:

a = número de bandas presentes em x e y ;

b = número de bandas presentes em x , mas ausentes em y ;

c = número de bandas presentes em y , mas ausentes em x .

O dendrograma foi obtido a partir do método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average). A matriz de similaridade e o dendrograma foram calculados utilizando o programa NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02i (ROHLF, 1992).

A matriz para o cálculo da análise de variância molecular foi preparada com auxílio do programa AMOVA-PREP versão 1.01 (MILLER, 1998). As comparações dentro e entre as populações de *Anopheles cruzii* foram realizadas através da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992), utilizando o programa AMOVA versão 1.5.5.

Os cálculos das identidades e distâncias genéticas entre populações de *Anopheles cruzii*, e do número de migrantes por geração (Nm) foram realizados através do programa POPGENE versão 1.32 (YEH *et al.*, 1999) utilizando o *menu* para marcadores dominantes e a opção para dados diplóides. Cada banda foi assumida como um loco com dois alelos. Para a realização dos cálculos, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi assumido. As identidades

e distâncias genéticas entre populações de *Anopheles cruzii* amostradas foram calculadas através do coeficiente de NEI (1972).

O programa TFPGA (Tools for Populations Genetics Analyses) versão 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para construção do dendrograma contendo amostras das três espécies analisadas e para cálculo do suporte dos nós (*bootstrap*).

3.4 Análise dos perfis de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* e comparação com *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*

3.4.1 Amostras analisadas

A partir dos resultados obtidos na análise por PCR-RAPD, amostras representativas de cada um dos agrupamentos formados e de todas as localidades amostradas foram selecionadas. Para comparação com os resultados obtidos para *Anopheles cruzii*, amostras das espécies *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* foram incluídas na análise. O número de indivíduos analisados encontra-se na tabela abaixo (Tabela IV).

Tabela IV. Espécies, locais de coleta e número de indivíduos de *Anopheles* (*Kerteszia*) spp. analisados através de PCR-RFLP

Espécie	Estado	Localidade	Número de exemplares
<i>Anopheles cruzii</i>	Santa Catarina	São Francisco do Sul	10
		Florianópolis	2
	Paraná	Guaratuba	2
		Morretes	12
		Paranaguá	6
<i>Anopheles bellator</i>	São Paulo	Cananéia	10
	Paraná	Paranaguá (Ilha do Mel)	2
	São Paulo	Cananéia	2
<i>Anopheles homunculus</i>	Santa Catarina	São Francisco do Sul	2
Total de indivíduos analisados			48

3.4.2 PCR

As reações de amplificação foram realizadas a partir de DNA extraído pelo método descrito no item 3.3.4. Cada reação foi conduzida em volume total de 25µl, 1X tampão, 3mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 15pmol de cada iniciador (Invitrogen), 4-6ng/µl de DNA, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli-Q estéril para completar o volume final. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se os seguintes ciclos de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento a 58°C por dois minutos e extensão a 72°C por dois minutos; seguidos de extensão final a 72°C por cinco minutos. As sequências dos iniciadores, utilizados para amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S, encontram-se na Tabela V. O iniciador CP17 anela-se ao gene 5.8S, enquanto o iniciador CP16 anela-se ao gene 28S.

Tabela V. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles (Kerteszia)* spp.

Iniciador	Sequência (5'→3')	Referência
CP17(f)	GCGCCGCGGTGTGAACTGCAGGACACATG	MALLAFRONTÉ <i>et al.</i> (1997)
CP16(r)	GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGGTA	MALLAFRONTÉ <i>et al.</i> (1997)

3.4.3 Reação de restrição

A seleção das endonucleases utilizadas para restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, foi realizada a partir das seqüências disponíveis no GenBank (números de acesso AF417739 e AF035227). Estas seqüências foram analisadas através do programa WebCutter 2.0 (HEIMAN, 1997) para verificar quais enzimas apresentam sítios de restrição na região ITS2 dessa espécie. Oito enzimas foram selecionadas, as quais reconhecem seqüências de 4pb (*Bst*UI, *Hae*III, *Taq*I e *Hha*I), 5pb (*Sau*96I e *Hin*fI) e 6pb (*Hin*cII e *Nru*I).

O sistema contendo 5-10µl do produto de amplificação, excesso de enzima (3-5U), 1X tampão e água Milli-Q para volume final de 10-20µl, foi incubado durante 3-4 horas sob temperatura adequada à cada endonuclease (Tabela VI).

3.4.4 Eletroforese

Após a reação de restrição, os fragmentos obtidos foram fracionados em gel de agarose 2% a 4V/cm, corados com solução de brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Como marcadores de peso molecular foram utilizados: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), 50pb DNA Ladder (Invitrogen) e 123pb DNA Ladder (Invitrogen).

3.4.5 Análise dos resultados

Os padrões de restrição obtidos foram comparados com as seqüências (AF417739 e AF035227) obtidas por MALLAFRONTÉ *et al.* (1997). Para essas seqüências, foram calculados os comprimentos dos fragmentos que seriam produzidos a partir da restrição

com as enzimas acima citadas. A posição dos sítios de restrição, bem como o comprimento dos fragmentos, foram estimados a partir das duas sequências.

Tabela VI. Endonucleases utilizadas para restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*.

Endonuclease	Seqüência reconhecida	Comprimento	Temperatura (°C)
<i>Bst</i> UI	cg/cg	4pb	60
<i>Sau</i> 96I	g/gncc	5pb	37
<i>Hae</i> III	gg/cc	4pb	37
<i>Hinc</i> II	gty/rac	6pb	37
<i>Hin</i> fI	g/antc	5pb	37
<i>Hha</i> I	gcg/c	4pb	37
<i>Nru</i> I	tcg/cga	5pb	37
<i>Taq</i> I	t/cga	4pb	65

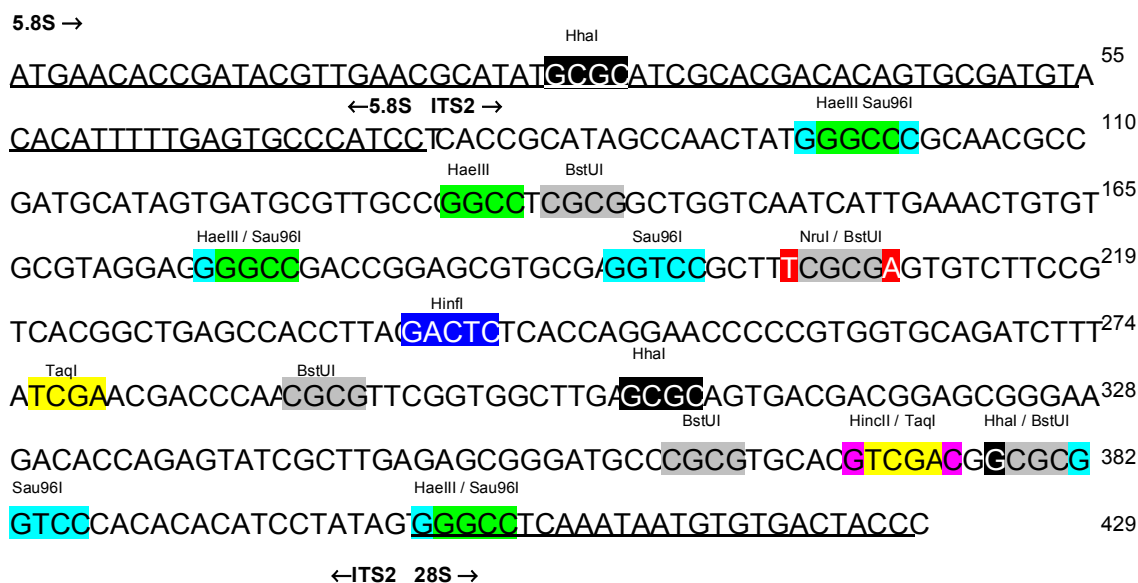


Figura 5. Seqüência da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* (Município de Juquiazinho – Estado de São Paulo) (MALLAFRONT *et al.*, 1997 - número de acesso AF035227) contendo os sítios de restrição das endonucleases: *Bst*UI, *Sau*96I, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hinc*II, *Nru*I e *Taq*I. Regiões sublinhadas correspondem aos genes 5.8S e 28S.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Polimorfismos em *Anopheles cruzii* detectados através de PCR-RAPD, e comparação com *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*

A variabilidade genética em *Anopheles cruzii* foi investigada através da análise de polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD). Dos 143 iniciadores previamente testados em uma amostra, 29 não geraram produtos de amplificação, 51 geraram bandas muito fracas e 63 foram novamente testados em 20 amostras. Os iniciadores que não geraram produtos de amplificação, nas condições estabelecidas nesse estudo, foram indicados com asterisco (Apêndice I).

Na segunda etapa de seleção de iniciadores, 20 amostras foram utilizadas. A maioria dos iniciadores re-testados, produziu inúmeras bandas discretas e difíceis de serem comparadas entre amostras presentes em diferentes géis. Por isso, sete iniciadores foram escolhidos (OPA-01, OPA-11, OPY-02, OPY-05, OPY-10, OPY-15 e OPY-16), sendo utilizados para a comparação entre amostras de *Anopheles cruzii*. Os resultados obtidos com amostras dessa espécie foram comparados àqueles obtidos com outras espécies de *Kerteszia*.

A comparação entre amostras de *Anopheles bellator* coletadas em Cananéia e Paranaguá, foi realizada com oito iniciadores. Os iniciadores utilizados para a amplificação do DNA de *Anopheles cruzii* também foram empregados para amplificar o DNA dessa espécie, porém o iniciador OPG-03 foi incluído, pois produziu bandas adequadas para comparação entre amostras de *Anopheles bellator*. Em *Anopheles cruzii* esse iniciador amplificou grande número de polimorfismos, difíceis de serem comparados entre amostras.

Para comparação entre indivíduos de mesma progênie, pertencentes a *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator*, foram utilizados seis iniciadores. Os iniciadores OPA-01 e OPG-03 não foram utilizados.

A possibilidade de identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*, através de marcadores RAPD, foi investigada através da utilização de sete iniciadores, previamente descritos para comparação entre amostras de *Anopheles cruzii*.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se na Tabela VII.

Tabela VII. Seqüências e conteúdo GC (%) dos iniciadores utilizados na reação de PCR-RAPD

Iniciadores	Seqüências (5'→3')	%GC
OPA-01	CAGGCCCTTC	70
OPA-11	CAATCGCCGT	60
OPG-03	GAGCCCTCCA	70
OPY-02	CATCGCCGCA	70
OPY-05	GGCTGCGACA	70
OPY-10	CAAACGTGGG	60
OPY-15	AGTCGCCCTT	60
OPY-16	GGGCCAATGT	60

4.1.1 Análise da variabilidade genética entre indivíduos de *Anopheles cruzii* pertencentes a mesma progênie e comparação com *Anopheles bellator*

Os perfis obtidos através da amplificação do DNA de *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator* com os iniciadores OPA-11, OPY-02, OPY-05, OPY-10, OPY-15 e OPY-16, revelaram grande número de fragmentos polimórficos, indicando que existe grande variabilidade genética entre indivíduos irmãos e que esta é variável de acordo com o iniciador utilizado. Nas figuras 6 a 14, são apresentados os diferentes perfis obtidos com os seis iniciadores nas diferentes progênies das duas espécies analisadas.

A sensibilidade na detecção de polimorfismos com RAPD é muito poderosa para a identificação de genótipos e obtenção de “*fingerprints*” genômicos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Os polimorfismos podem ser resultantes de pequenas alterações na sequência de DNA de diferentes indivíduos, decorrentes de mudanças na sequência do sítio de iniciação (inserções/deleções/substituições) ou de alterações que modifiquem o tamanho da sequência a ser amplificada (inserções/deleções). Assim, diferenças em apenas um par de bases podem ser detectadas pela técnica (WILLIAMS *et al.*, 1990), e por isso grande número de polimorfismos pode ser revelado em indivíduos proximamente relacionados, inclusive irmãos.

Dentre os fragmentos obtidos em *Anopheles cruzii*, alguns foram observados em todas as progênies, enquanto outros mostraram-se exclusivos à determinada família ou a um conjunto de indivíduos dentro da progênie. Por exemplo, os fragmentos de aproximadamente 2550pb, 2250pb, 1350pb e 880pb (OPY-05), 550pb (OPY-10), 1120pb e 1150pb (OPY-02), 1300pb (OPA-11) e 2500pb (OPY-15) foram amplificados em todas as progênies, enquanto a banda de aproximadamente 650pb amplificada com o iniciador OPY-10 foi observada somente em alguns indivíduos da progênie B.

Em *Anopheles bellator*, também foram observadas diferenças quanto ao padrão de bandas geradas entre indivíduos irmãos e entre progênies, e todos os iniciadores foram

capazes de revelar polimorfismos. As bandas de 2300pb, 2000pb e 1200pb (OPY-02), 1000pb (OPY-10), 1700pb (OPA-11) e 470pb e 570pb (OPY-16) foram observadas em todas as famílias analisadas. Enquanto, as demais foram polimórficas entre indivíduos irmãos e/ou entre as progênes.

Em Culicidae, poucos trabalhos têm analisado a variabilidade genética entre indivíduos irmãos, e portanto, torna-se difícil a comparação com os resultados aqui obtidos. Os trabalhos realizados, até o momento, estão relacionados com *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (BALLINGER-CABTREE *et al.*, 1992; FAVIA *et al.*, 1994a).

Os polimorfismos observados entre indivíduos de mesma geração parental podem estar associados ao tipo de reprodução exibido pelas espécies, tendo em vista que a reprodução sexuada constitui-se num dos principais mecanismos para produzir indivíduos geneticamente diferentes. Em organismos com esse tipo de reprodução, o número de polimorfismos detectados pela PCR-RAPD é grande e os *loci* considerados polimórficos podem estar presentes em um ou ambos parentais. Já em espécies de insetos partenogênicos (reprodução assexuada), os indivíduos irmãos são geneticamente idênticos (clones) e por isso apresentam mesmo padrão de bandas RAPD. Em *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Hemiptera, Aphididae), por exemplo, BLACK *et al.* (1992) verificaram que diferentes ninfas geradas a partir de uma mesma fêmea, não apresentam diferenças quanto aos perfis RAPD.

No presente trabalho, apenas fêmeas foram coletadas e como não é possível a manutenção de espécies de *Anopheles (Kerteszia)* em laboratório, não foi possível verificar a segregação das bandas de parentais para descendentes e nem o padrão de herança. Porém, algumas bandas RAPD podem segregar como marcadores mendelianos (FAVIA *et al.*, 1994a; TAVARES *et al.*, 2001).

FAVIA *et al.* (1994a) verificaram que quando uma fêmea de *Anopheles gambiae* heterozigota para um dado *locus* RAPD era cruzada com um macho que não apresentava determinado fragmento, a presença dessa banda era observada em parte da progênie (8 em

18). BALLINGER-CABTREE *et al.* (1992) apontam que em *Aedes aegypti*, embora o número total e tamanho dos fragmentos variem entre indivíduos irmãos, os fragmentos presentes na geração F1 são observados nos progenitores.

Outra possibilidade para explicar o número de fragmentos polimórficos entre indivíduos irmãos, nas espécies analisadas, envolve a cópula com mais de um macho. Embora em *Aedes aegypti*, as fêmeas tornem-se refratárias a subseqüentes cópulas devido a ação de substâncias produzidas pelas glândulas acessórias do machos e que são transferidas durante a cópula, no gênero *Anopheles* existem evidências de que podem ocorrer múltiplas cópulas (KLOWDEN, 2001). Em *Anophele gambiae*, por exemplo, o macho produz uma massa gelatinosa que forma um tampão de cópula para impedir a fertilização da fêmea por outros indivíduos. Entretanto, esta proteção não é efetiva e o tampão pode ser dissolvido em menos de 24 horas (FORATTINI, 2002), permitindo que a fêmea possa ser fecundada mais de uma vez. Como os exemplares analisados são originários de fêmeas fecundadas em campo, não há garantia de que todos os indivíduos produzidos por uma mesma fêmea sejam resultantes da cópula exclusiva com um macho.

O estudo da variabilidade entre indivíduos irmãos, através da técnica PCR-RAPD, permite o reconhecimento de fragmentos variáveis dentro da espécie, e que poderiam ser erroneamente utilizados como caracteres taxonômicos para identificação de espécies semelhantes ou indistinguíveis morfologicamente (crípticas), especialmente quando poucas amostras são analisadas. Além disso, permite o melhor entendimento da variabilidade dentro e entre diferentes populações, ou seja, se certa heterogeneidade quanto aos fragmentos amplificados é observada entre indivíduos de mesma geração filial, conseqüentemente, grande variabilidade genética entre indivíduos de uma população local ou de localidades diferentes também é esperada.

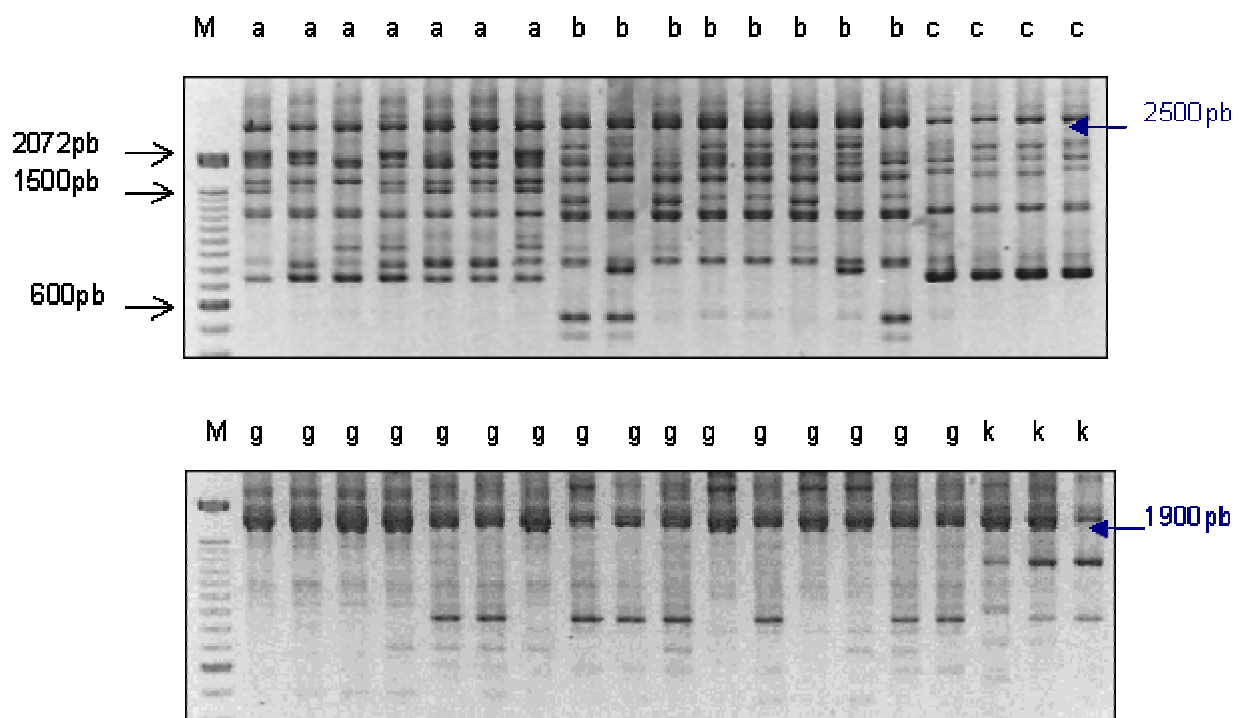


Figura 6. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de mesma progênie, obtidos com o iniciador OPY-15. *Anopheles cruzii* (a, b, c) e *Anopheles bellator* (g, k). (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

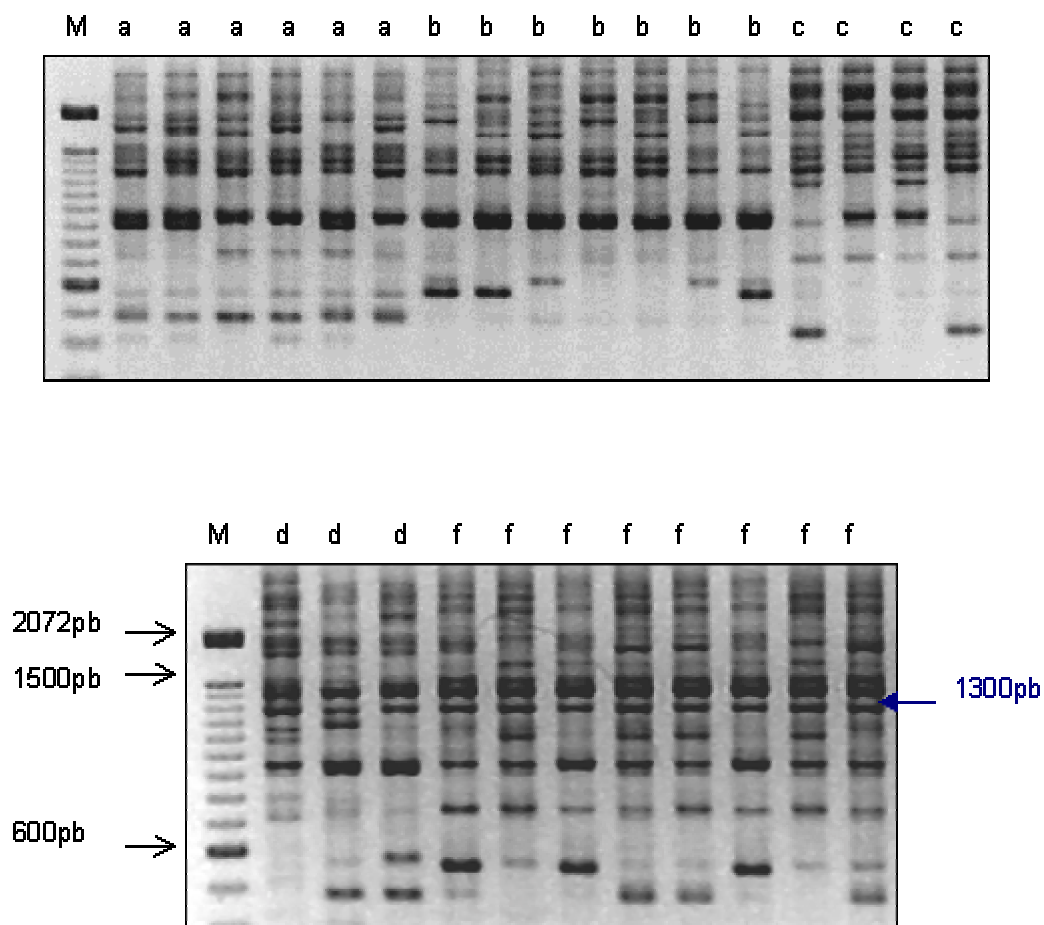


Figura 7. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de *Anopheles cruzii* de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPA-11. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

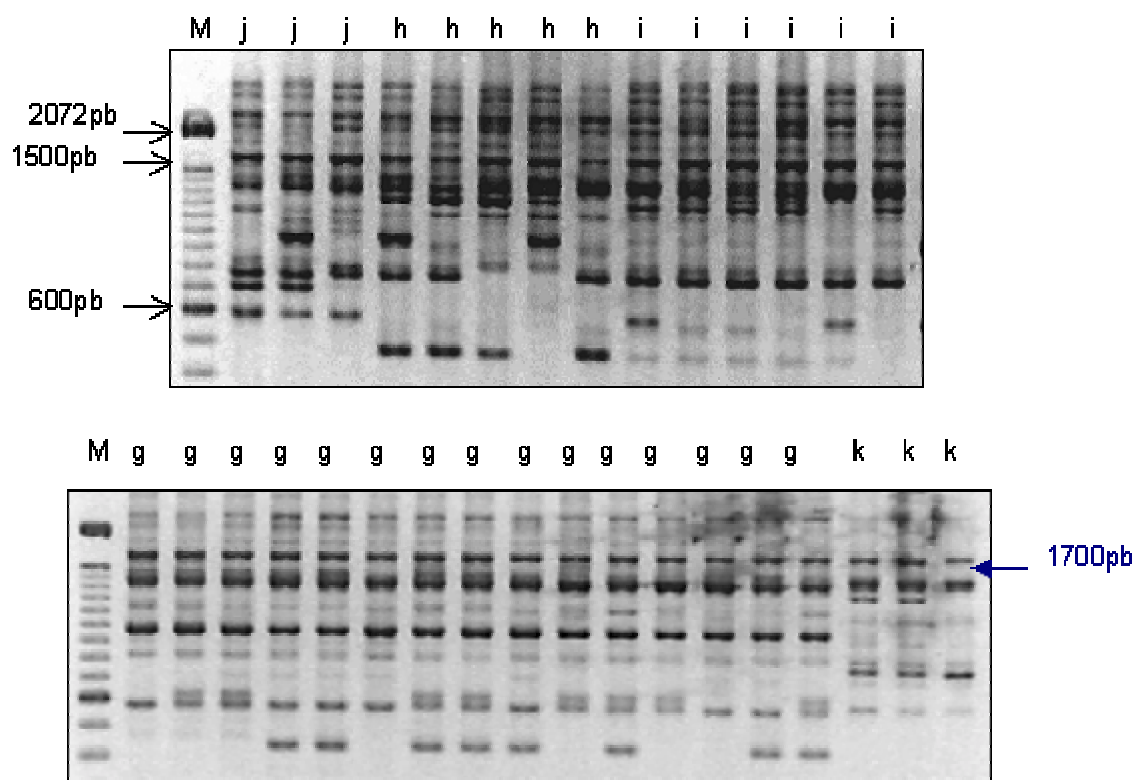


Figura 8. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de *Anopheles bellator* de mesma progênie (g, h, i, j, k), obtidos com o iniciador OPA-11. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

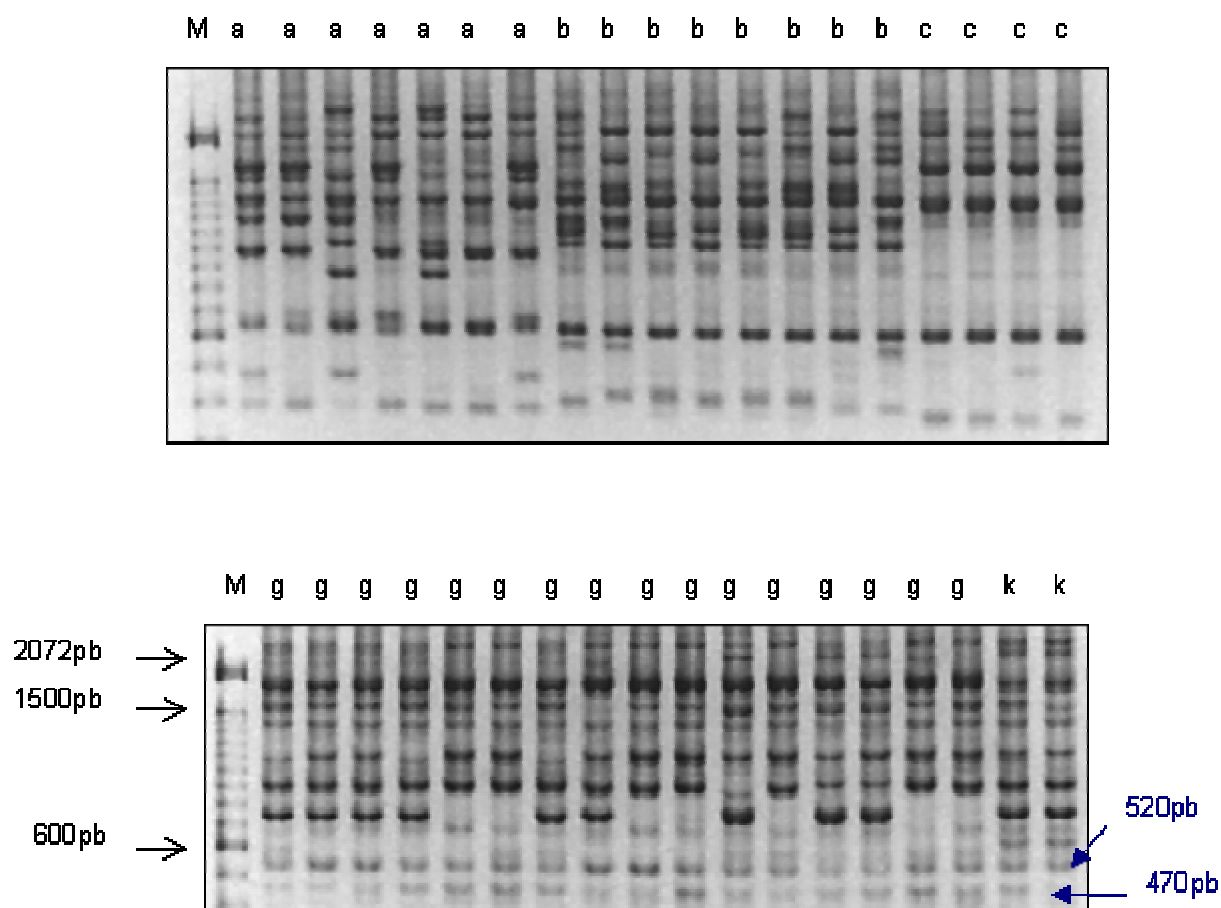


Figura 9. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de mesma progênie de *Anopheles cruzii* (a, b, c) e *Anopheles bellator* (g, k) obtidos com o iniciador OPY-16. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

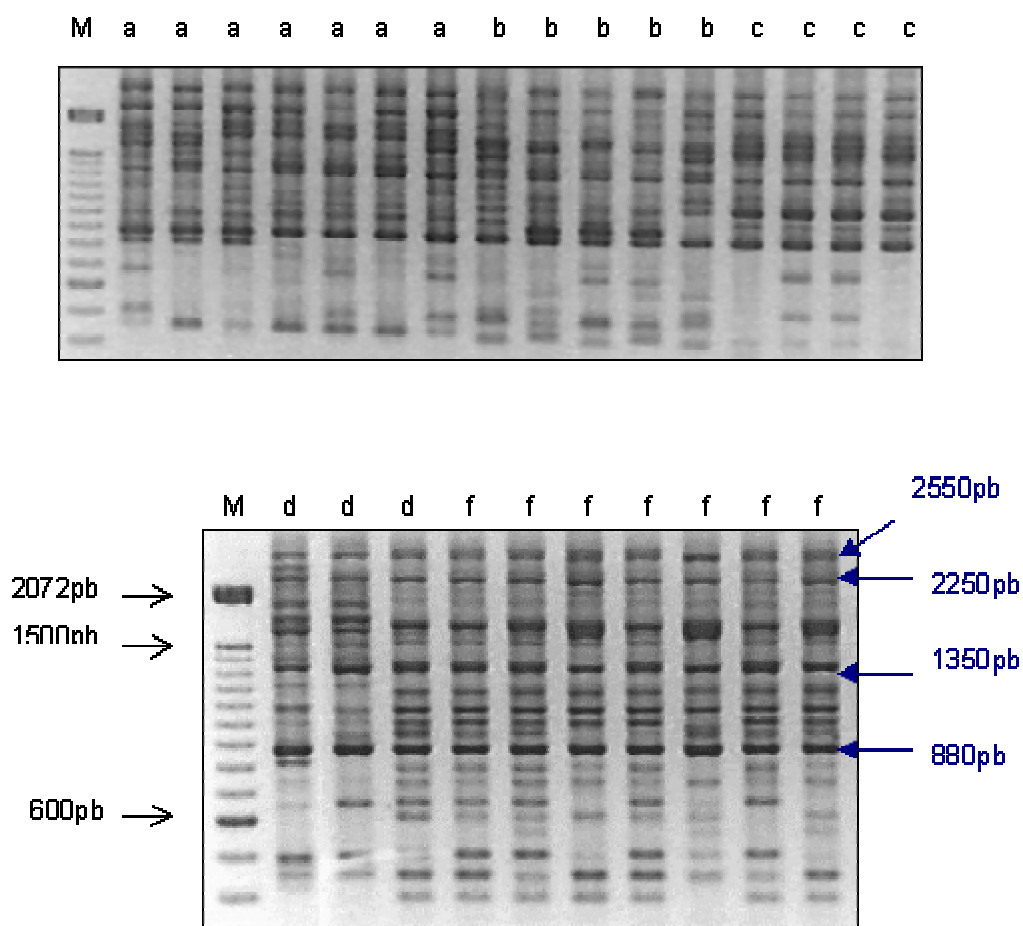


Figura 10. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de *Anopheles cruzii* de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPY-05. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

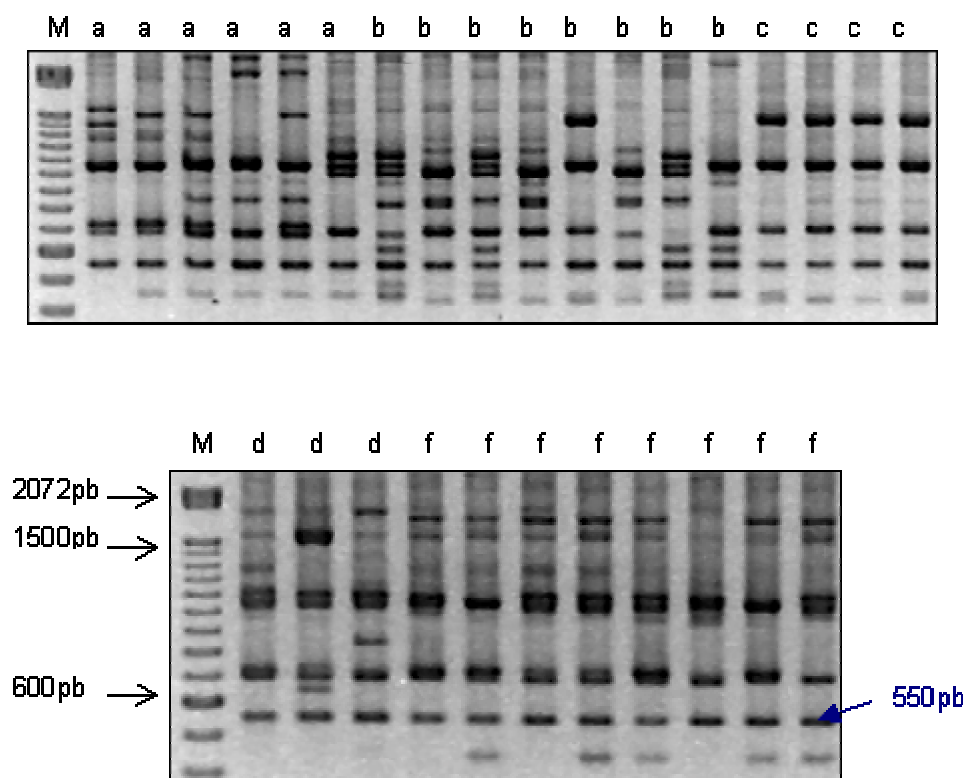


Figura 11. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de *Anopheles cruzii* de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPY-10. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

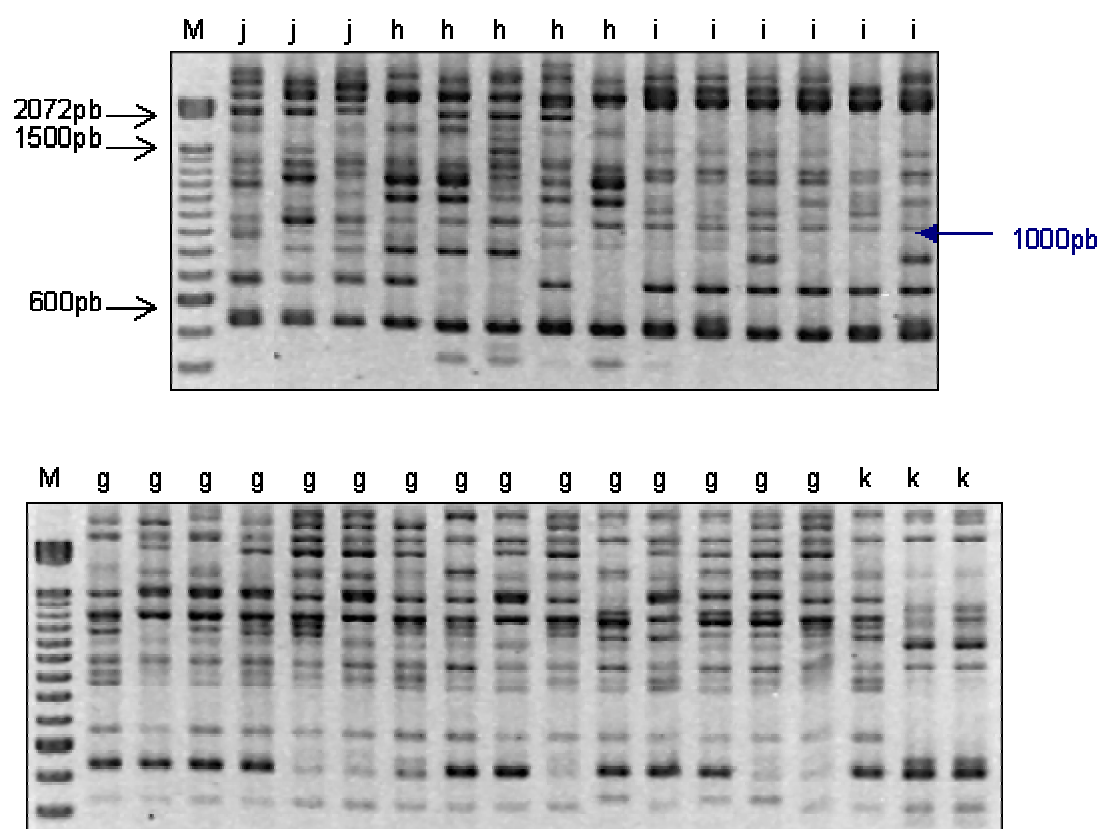


Figura 12. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de *Anopheles bellator* de mesma progênie (g, h, i, j, k), obtidos com o iniciador OPY-10. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

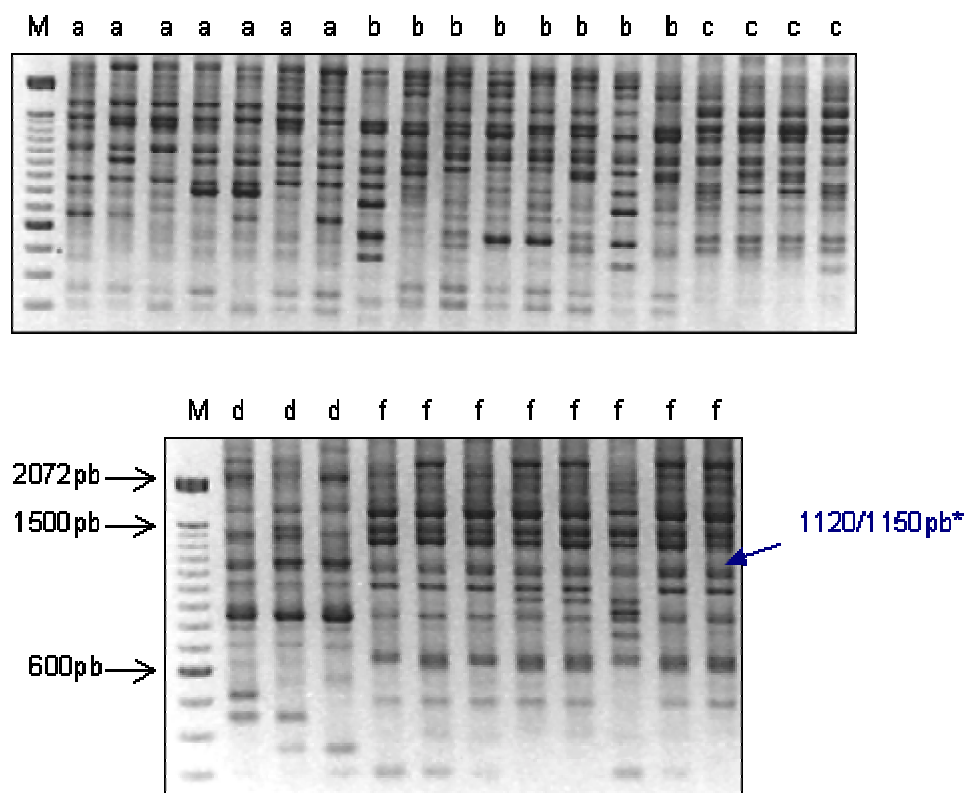


Figura 13. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* de mesma progênie (a, b, c, d, f), obtidos com o iniciador OPY-02. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos. *dois fragmentos de pesos moleculares próximos, melhor visualizados diretamente no gel.

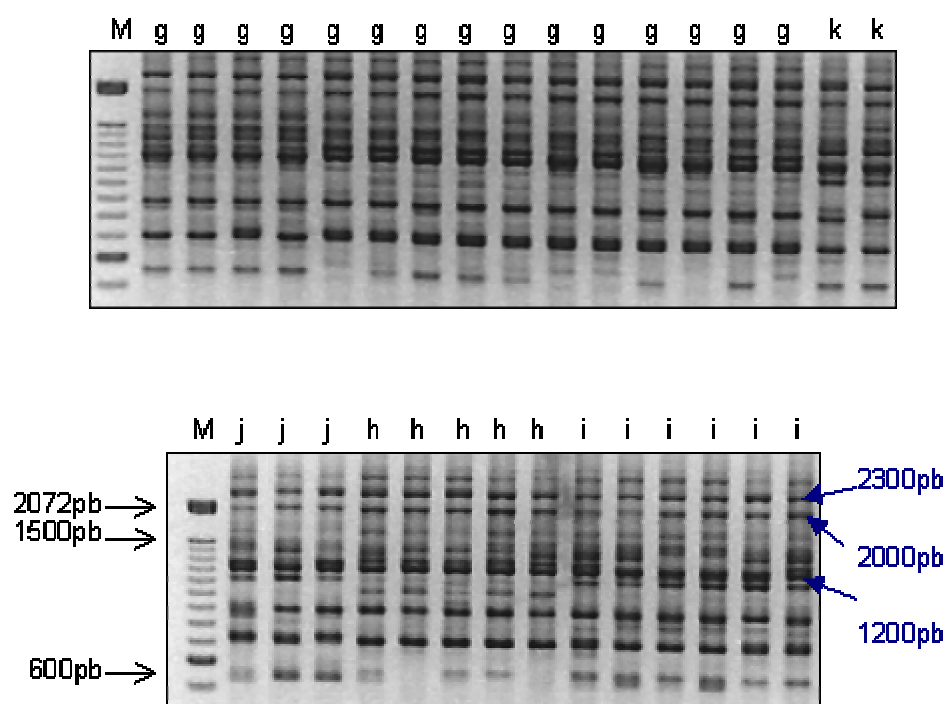


Figura 14. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD, em indivíduos de *Anopheles bellator* de mesma progênie (g, h, i, j, k), obtidos com o iniciador OPY-02. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Letras semelhantes indicam indivíduos irmãos.

4.1.2 Análise da variabilidade genética entre amostras de diferentes populações de *Anopheles cruzii*

A amplificação do DNA de amostras de *Anopheles cruzii* através da técnica PCR-RAPD revelou grande número de bandas e alto nível de polimorfismos, tanto em indivíduos de mesma localidade quanto em amostras de diferentes populações. As bandas amplificadas apresentaram pesos moleculares de 250pb a 3000pb. Os resultados obtidos utilizando os sete iniciadores (OPA-01, OPA-11, OPY-02, OPY-05, OPY-10, OPY-15 e OPY-16) estão representados nas figuras 16 a 22.

Os sete iniciadores utilizados amplificaram diferentes classes de bandas: monomórficas, polimórficas com alta frequência entre amostras e polimórficas exclusivas a um ou poucos indivíduos. O número desses fragmentos amplificados foi diferente para cada iniciador e para cada localidade analisada. Os iniciadores OPY-10, OPY-05 e OPY-02 forneceram fragmentos monomórficos e polimórficos, enquanto os demais (OPA-1, OPA-11, OPY-15 e OPY-16) amplificaram apenas fragmentos polimórficos, quando todas as amostras são analisadas.

Seis bandas foram constantes em todos os indivíduos, podendo ser caracterizadas como marcadores moleculares espécie-específicos. O iniciador OPY-10 amplificou uma banda (550pb) constante em todas as amostras. O iniciador OPY-05 forneceu três fragmentos monomórficos, com pesos moleculares aproximados de 880pb, 2250pb e 2550pb. O iniciador OPY-02 amplificou duas bandas monomórficas, situadas muito próximas, com pesos moleculares de 1100pb e 1150pb (melhor visualizadas diretamente no gel). A amplificação com OPY-02 detectou, ainda, outra banda constante (700pb) em todas as populações amostradas. Embora esta banda tenha sido observada em todas as repetições (1-2), não foi verificada nas comparações realizadas entre indivíduos de mesma progênie, sendo por isso considerada não reproduzível.

A presença de fragmentos polimórficos e monomórficos amplificados com os iniciadores, pode ser resultado do anelamento dos iniciadores em regiões mais ou menos variáveis do genoma de *Anopheles cruzii*. KHAMAMPATI *et al.* (1992) destaca que a presença de fragmentos monomórficos é dependente do iniciador utilizado e que nem todos os iniciadores testados amplificam fragmentos espécie-específicos ou marcadores que são fixados ao longo da área de distribuição da espécie.

Alguns fragmentos, embora polimórficos, foram observados na maioria das amostras. Na tabela VIII, são apresentados os fragmentos com frequência igual ou superior a 90%, levando-se em consideração o total de amostras analisado.

MANGUIN *et al.* (1999) ao analisarem diferentes populações de *Anopheles darlingi*, utilizando cinco iniciadores e 35 bandas, encontraram apenas dois fragmentos constantes em todos os indivíduos e sete presentes em mais de 95% das amostras. Estes resultados e os aqui apresentados confirmam o elevado número de polimorfismos, em espécies do gênero *Anopheles*, que podem ser revelados pela técnica PCR-RAPD.

Além de fragmentos com alta frequência, também foram observados fragmentos polimórficos exclusivos a um ou dois indivíduos. Por exemplo, dos 139 indivíduos analisados, apenas dois indivíduos apresentaram o fragmento de aproximadamente 650pb amplificado com o iniciador OPY-10, um deles pertencente a progênie B. Estes polimorfismos de baixa frequência podem representar variações intraespecíficas, conforme observado também para indivíduos de uma mesma progênie.

A presença de fragmentos exclusivos a um indivíduo e de fragmentos constantes em todas as amostras de mesma espécie também foram detectados por KAMBAMPATI *et al.* (1992) em espécies do complexo *Aedes scutellaris* e por BARUFFI *et al.* (1995) em *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). BALLINGER-CABTREE *et al.* (1992) também observaram heterogeneidade entre o número e peso molecular de fragmentos amplificados em diferentes indivíduos de *Aedes aegypti*, com fragmentos conservados entre indivíduos, subespécies e entre populações. POSSO *et al.* (2003) observaram diferenças na frequência de

bandas (RAPD) entre três populações de *Anopheles nuneztovari* coletadas na Colômbia, e afirmam que embora os indivíduos pertençam a mesma população, eles podem apresentar diferenças nos padrões de bandas geradas pela PCR-RAPD.

A presença de variabilidade (entre populações e também entre indivíduos dentro das populações) pode ser essencial para sobrevivência e para o sucesso em responder às mudanças ambientais (ALMEIDA *et al.*, 2003; HYMAN *et al.*, 1995). A variabilidade genética permite a melhor utilização do ambiente, pois produz plasticidade, tornando possível a utilização de diferentes recursos e microhabitats.

Tabela VIII. Fragmentos mais freqüentes em amostras de *Anopheles cruzii* coletadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, amplificados através de PCR-RAPD.

Iniciador	Peso molecular aproximado	Freqüência entre amostras (%)		
		Paraná	Santa Catarina	São Paulo
OPY-02	1360pb	96,6	88	97,4
	1150pb	100	100	100
	1100pb	100	100	100
	1000pb	91,5	90,5	100
OPY-05	2550pb	100	100	100
	2250pb	100	100	100
	1350pb	98,3	100	100
	880pb	100	100	100
OPY-10	550pb	100	100	100
OPY-15	2500pb	100	97,6	100
OPA-01*	900pb	89,8	95,2	86,8
OPA-11	1400pb	100	80,9	84,2
	1300pb	98,3	100	100

*fragmento com freqüência menor que 90% do total de amostras

Devido ao grande número de polimorfismos e às variações em intensidade, muitas bandas não puderam ser comparadas entre amostras presentes em diferentes géis, e por isso não foram consideradas para construção da matriz binária (presença/ausência) a ser utilizada na análise de agrupamento. Por exemplo, a banda de aproximadamente 250pb amplificada com iniciador OPA-01 apresentou maior frequência e intensidade em amostras de Morretes. Estas diferenças poderiam ser caracterizadas como artefatos produzidos pela técnica, entretanto seria esperado que amostras de outras populações também apresentassem, pelo menos em uma das repetições, maior intensidade e frequência, fato que não foi verificado. Para cada amostra foram realizadas três reações distintas, uma delas com diferente concentração de DNA.

FAVIA *et al.* (1994b) ao analisarem diferentes formas cromossômicas (Bamako, Mopti e Savanna) de *Anopheles gambiae* s.s. verificaram que alguns iniciadores amplificam “melhor” o DNA de algumas “linhagens” que de outras, mesmo utilizando o mesmo protocolo de extração de DNA, e que estas diferenças podem ser quantitativas e qualitativas. Segundo KAMBHAMPATI *et al.* (1992) fragmentos de DNA amplificados através da PCR-RAPD podem conter um número de cópias diferente no genoma, resultando em diferentes intensidades. Porém, a possibilidade de representarem artefatos produzidos pela técnica não pode ser descartada e por isso as bandas não foram utilizadas.

Do total de bandas amplificadas, 59 foram selecionadas para comparação entre amostras através da análise de agrupamento. Cinquenta e três bandas foram polimórficas (89,83%) e permitiram que todos os indivíduos pudessem ser diferenciados. A relação de similaridade entre as amostras está representada na figura 15.

Não foram observados marcadores “fixados” em amostras de uma mesma localidade, e a análise através do método UPGMA também não revelou nenhum padrão de agrupamento de acordo com a procedência das amostras. Entretanto, alguns exemplares coletados em Morretes, São Francisco do Sul e Cananéia formaram grupo distinto das demais amostras.

Analisando os fragmentos amplificados com os iniciadores OPA-01 e OPY-15, verificou-se que amostras de Morretes apresentaram perfis um pouco distintos daqueles observados para as demais localidades. O fragmento de aproximadamente 1300pb amplificado com OPA-01 foi verificado em mais de 80% das amostras procedentes de São Paulo e Santa Catarina e em apenas 17% das amostras obtidas de Morretes. Resultado semelhante ao observado para o fragmento de 850pb amplificado com o iniciador OPY-15, presente na maioria das amostras de São Paulo e Santa Catarina, mas ausente em grande número de amostras coletadas em Morretes. Os perfis obtidos para a maioria das amostras de Paranaguá e Guaratuba, com estes dois iniciadores, foram semelhantes aos observados para São Francisco do Sul e Cananéia. Cabe ressaltar que em Paranaguá (Parque do Palmito), *Anopheles cruzii* pode ser coletada em grande número durante o período diurno, fato que não foi observado nas demais localidades. Embora nessa área, a espécie apresente comportamento diferenciado do observado nas demais, não foram verificadas diferenças quanto aos perfis RAPD. Diferenças quanto ao comportamento podem estar associadas a fatores ambientais locais e que merecem investigações.

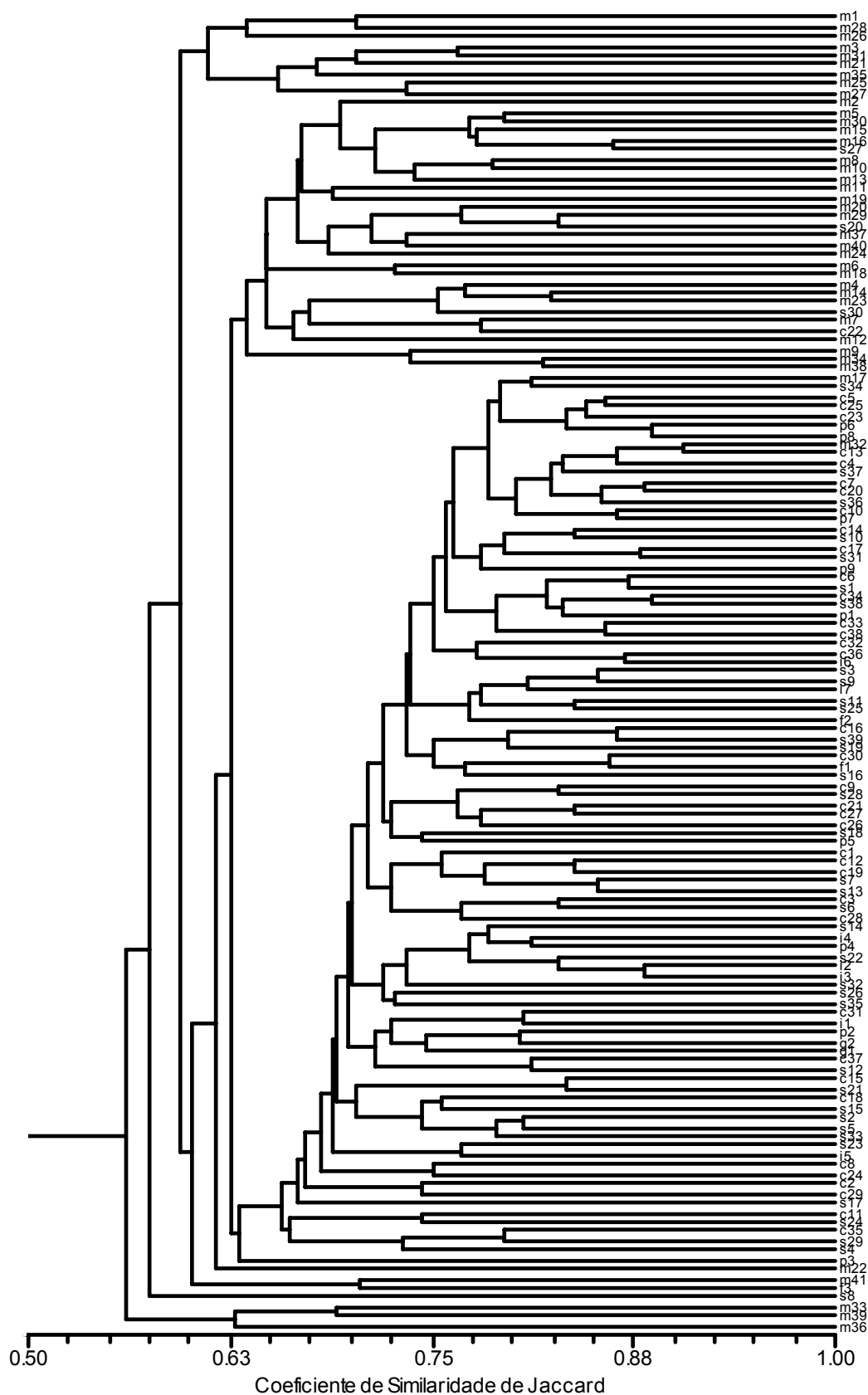


Figura 15. Dendrograma obtido a partir de fragmentos gerados pela PCR-RAPD, utilizando o método de agrupamento UPGMA e coeficiente de similaridade de Jaccard, em indivíduos de *Anopheles cruzii*. m. Morretes, i. Ilha do Mel, p. Paranaguá, g. Guaratuba, s. São Francisco do Sul, c. Cananéia, f. Florianópolis.

A análise da variância molecular (AMOVA) indicou que somente 11,26% da variação ocorre entre as populações, e que a maior variância, 88,74%, ocorre entre indivíduos dentro das populações (Tabela IX). Isto pode ser observado diretamente pela análise dos perfis gerados pelos iniciadores, onde grande número de bandas foram polimórficas entre indivíduos de uma mesma população.

O valor estimado de F_{st} (0.10) indicou moderada diferenciação entre populações.

Tabela IX. Análise da variância molecular (AMOVA) entre e dentro de populações de *Anopheles cruzii*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	Variância	%Variação
Entre populações	3	94,5923	0,755	11,26
Dentro das populações	135	804,4724	5,950	88,74
Total	138	899,0647	6,705	-

Considerando os valores limites de distância genética adotados por AYALA (1975), e SCHAFFENER *et al.* (2000), as distâncias genéticas obtidas, nesta investigação, foram baixas (0,0214-0,0673) e dentro do limite esperado para o nível de espécie. Isto sugere que as populações analisadas são geneticamente similares e constituem uma mesma espécie. A maior distância genética foi observada entre amostras de Morretes e São Paulo. Os valores de identidade genética foram altos (9,350-9,788) e estão representados na tabela X. Valores de identidade genética acima de 0,85 representam populações co-específicas (THORPE & SOLÉ-CAVA, 1994).

As baixas distâncias genéticas observadas entre as amostras podem estar relacionadas a proximidade entre as localidades estudadas, a qual permite a troca de material genético entre populações mediante a migração de indivíduos. RACHOU *et al.* (1949) verificaram a dispersão ativa de indivíduos entre a Ilha de Cotinga e a área urbana de Paranaguá, através do método de captura e recaptura. Segundo esses autores, as fêmeas dessa espécie apresentam raio de dispersão ativa de 2.093 metros sobre o oceano, e

apontam que este pode ser superior a dois quilômetros em condições topográficas favoráveis.

Como a similaridade genética entre as populações depende do número de migrantes por geração (Nm), essa taxa foi estimada para avaliar o potencial de dispersão de uma população para outra (fluxo gênico). O número de migrantes por geração foi de 4,3, indicando fluxo gênico entre as populações amostradas. Segundo ALMEIDA *et al.* (2003), quando o fluxo gênico entre populações é alto, estas evoluem de forma conjunta, porém quando pequeno, cada população evolui de maneira independente. Populações isoladas podem apresentar fenótipos distintos para fatores que afetam a capacidade vetorial (por exemplo, hematofagia, longevidade), os quais são importantes para a elaboração de estratégias de controle de vetores ao nível local (CONN *et al.*, 1999).

CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) através da análise de isoenzimas, também verificaram fluxo gênico entre populações de *Anopheles cruzii* coletadas nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, com 2,99 migrantes por geração e distâncias genéticas de NEI (1978) entre 0,032-0,083. Esses autores destacam que as populações presentes nesses estados são geneticamente similares e representam apenas uma espécie, o que corrobora os resultados aqui obtidos.

Tabela X. Identidade e Distância genética entre amostras de *Anopheles cruzii* coletadas em Morretes, Paranaguá+Guaratuba (P+G), São Paulo e Santa Catarina.

	Morretes	São Paulo	Santa Catarina	P+G
Morretes	*****	0,9350	0,9502	0,9434
São Paulo	0,0673	*****	0,9788	0,9753
Santa Catarina	0,0511	0,0214	*****	0,9751
P+G	0,0583	0,0250	0,0253	*****

*Os valores acima da diagonal correspondem a identidade genética e aqueles abaixo da diagonal correspondem a distância genética segundo NEI (1972).

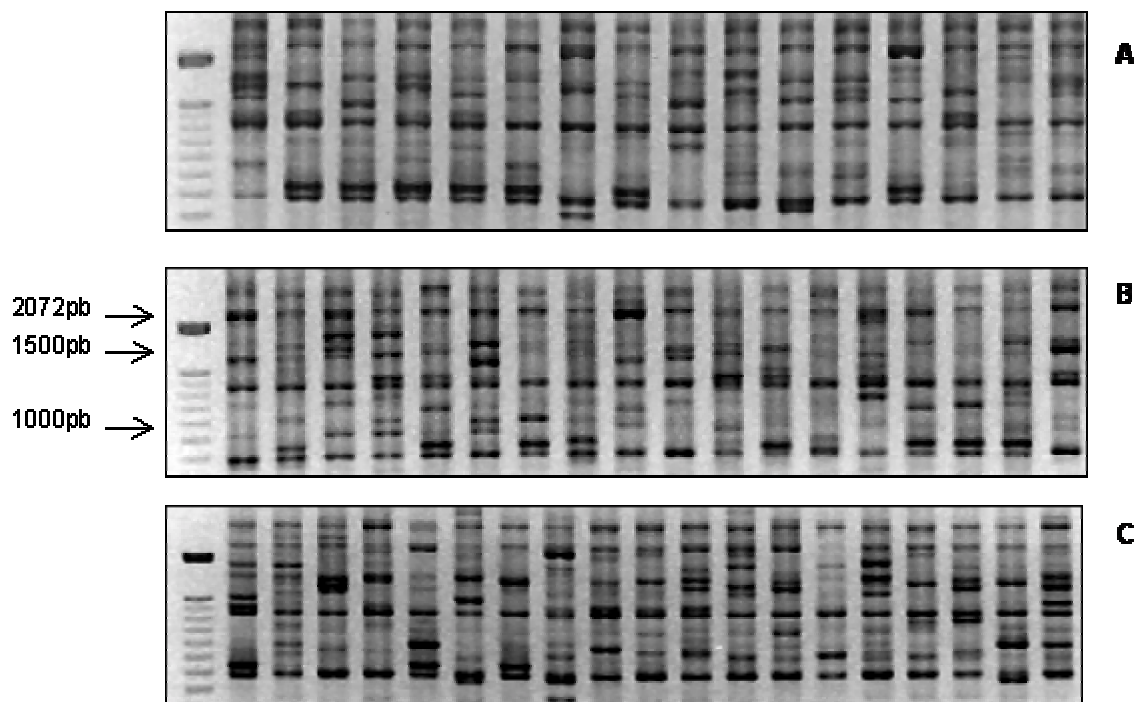


Figura 16. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPY-05. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

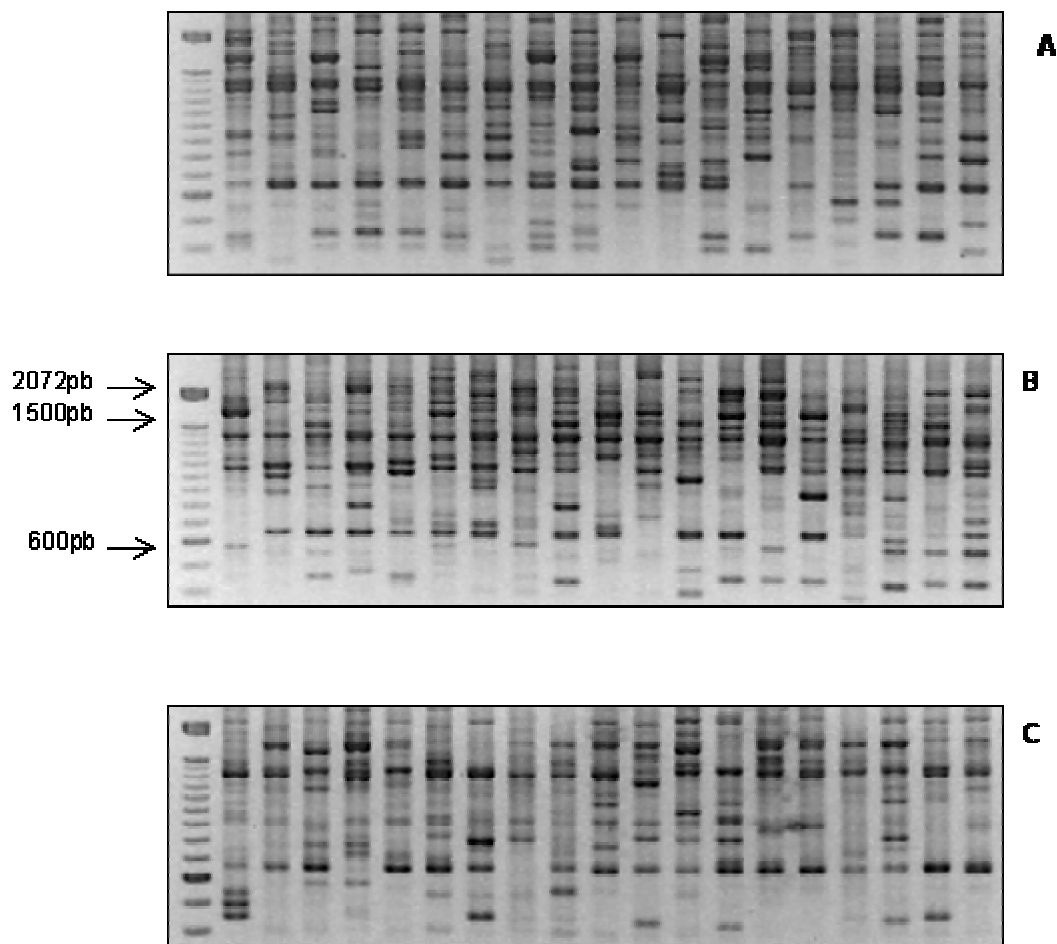


Figura 17. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPY-16. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

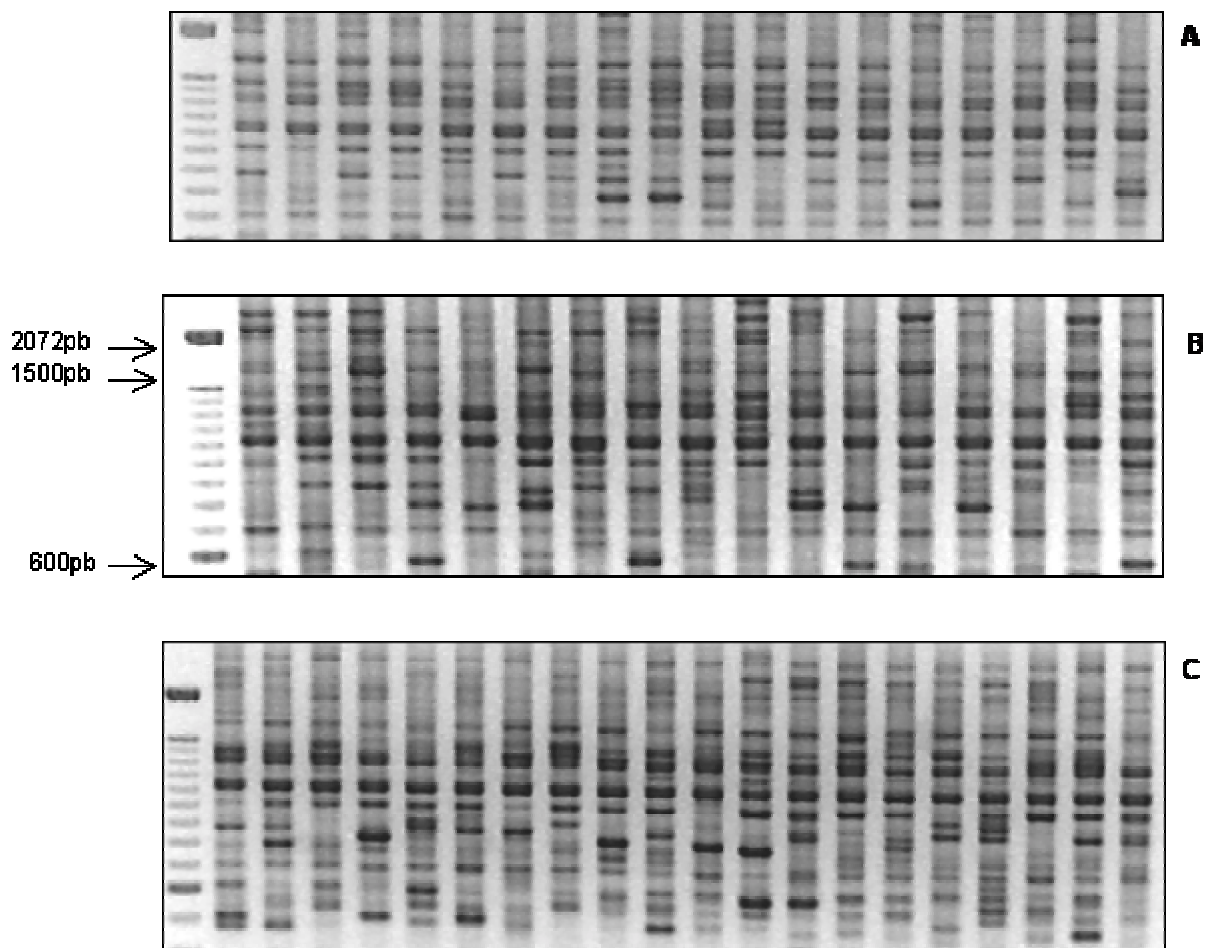


Figura 18. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPY-02. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

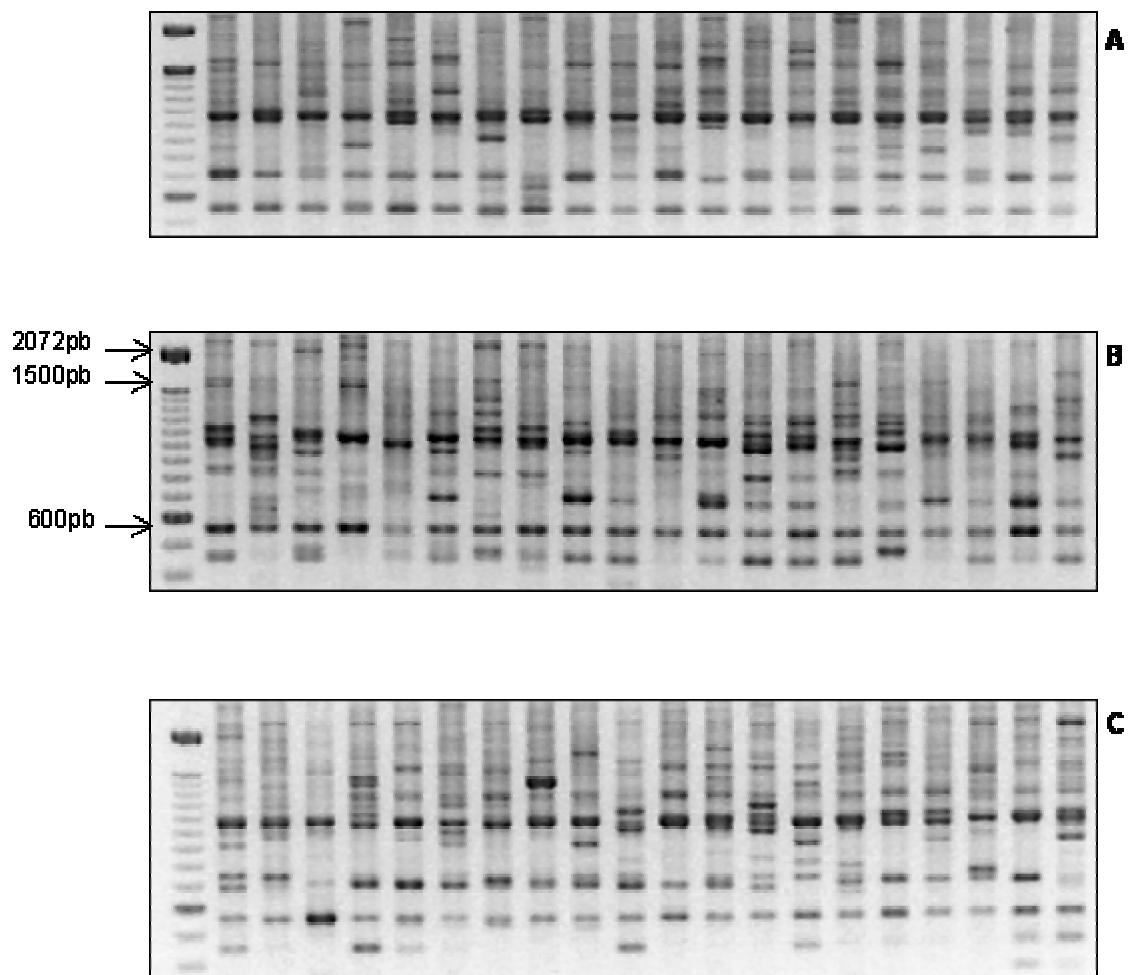


Figura 19. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPY-10. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

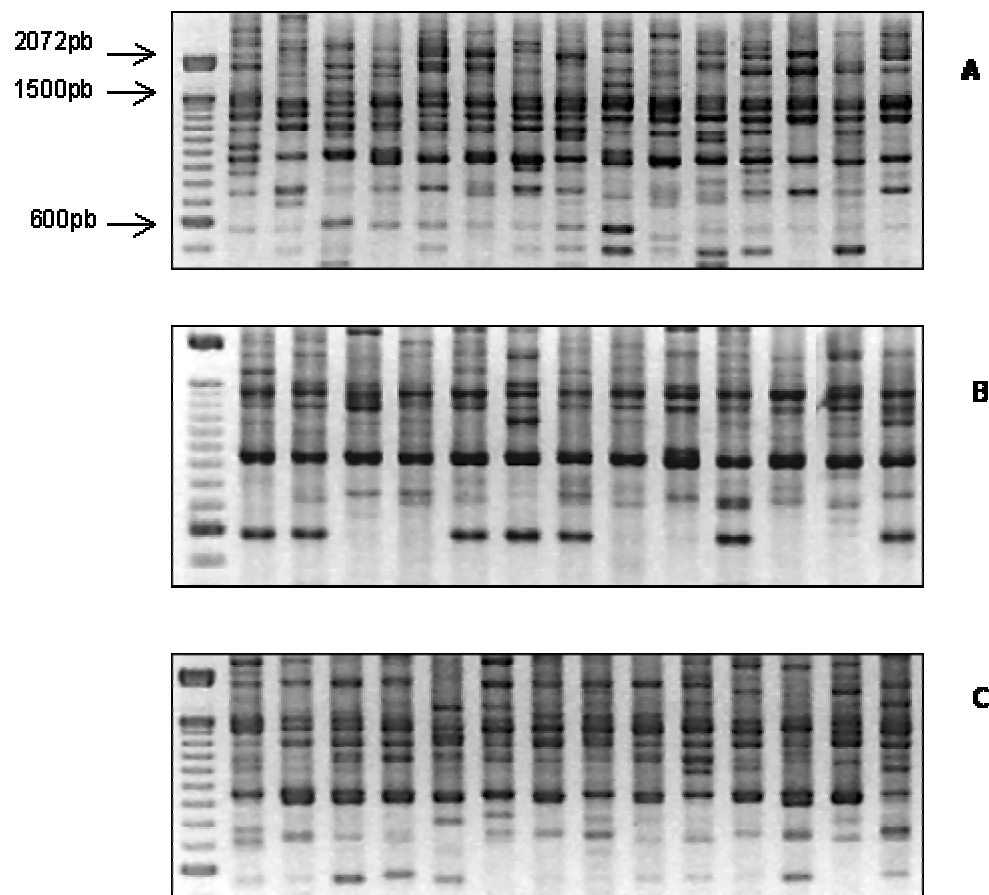


Figura 20. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPA-11. (M) Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

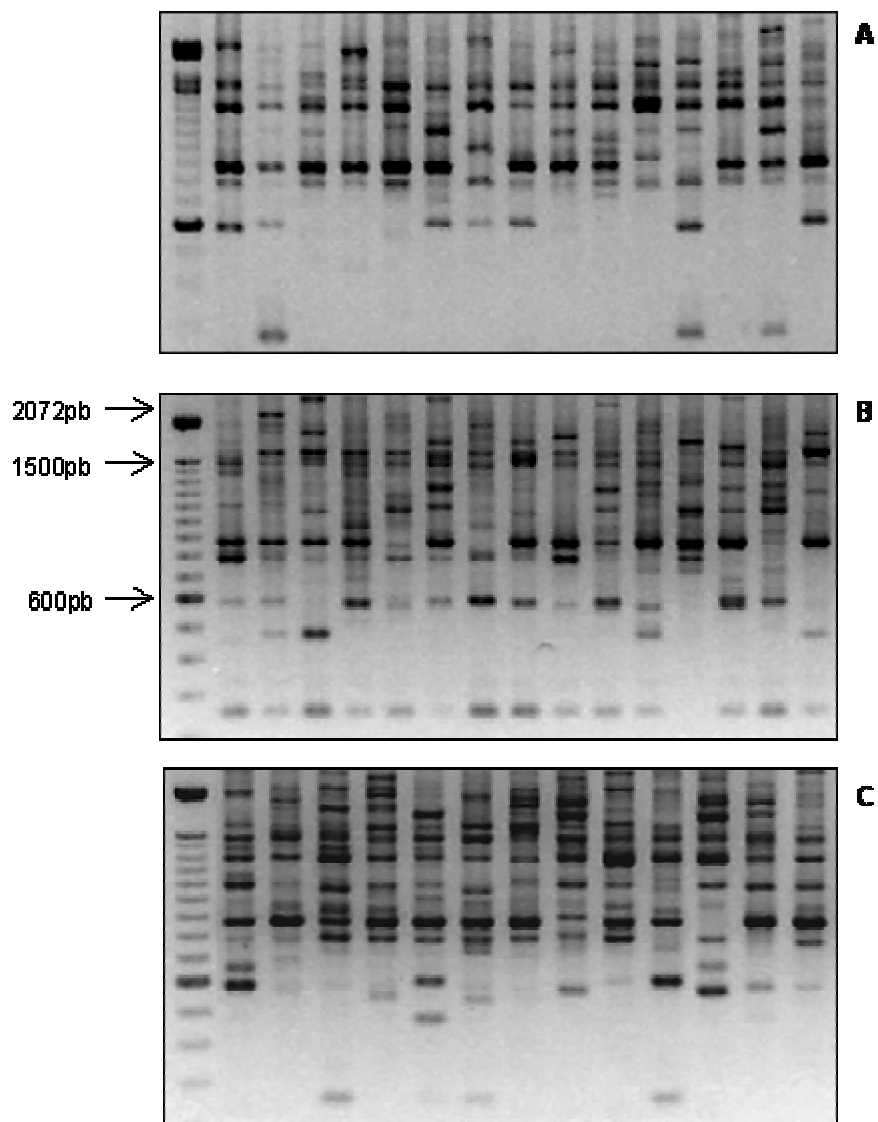


Figura 21. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPA-01. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

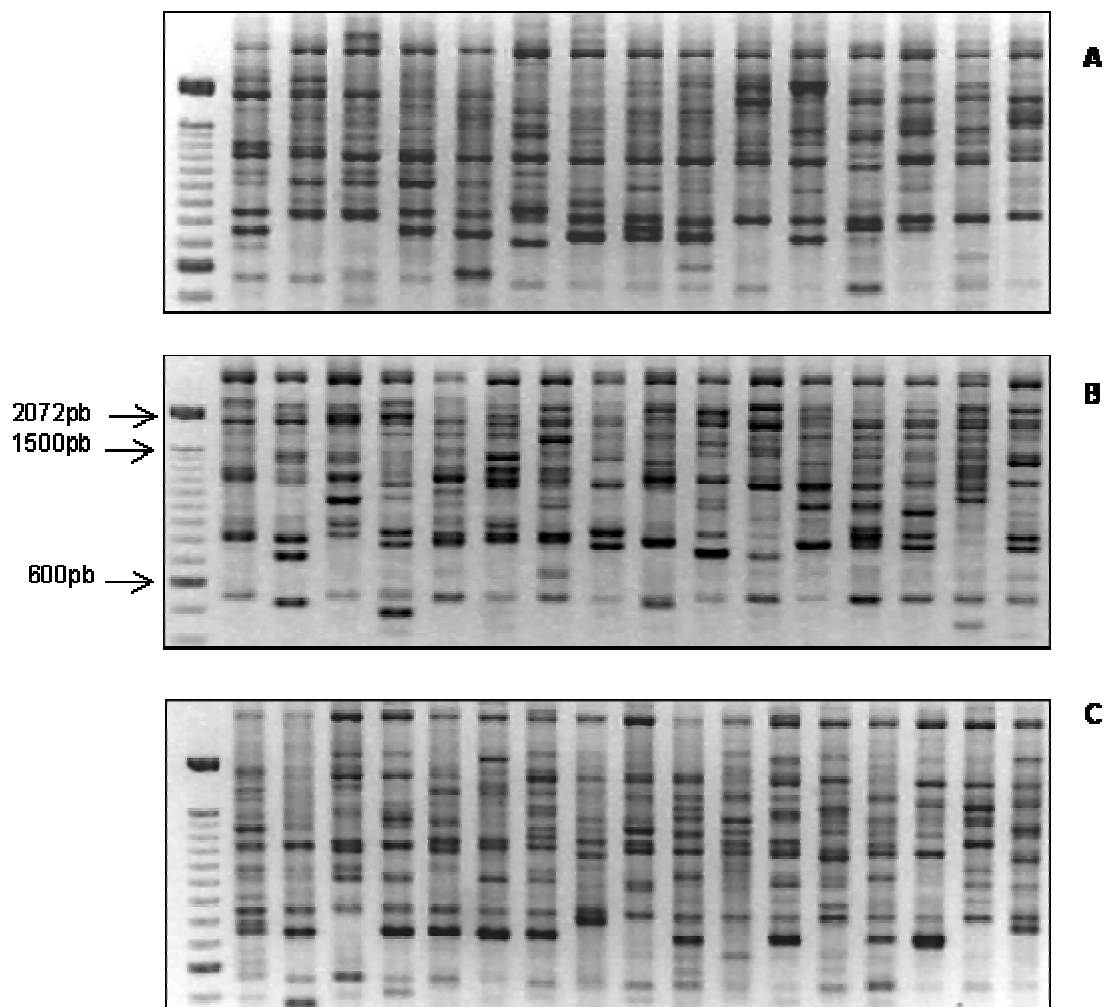


Figura 22. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles cruzii*, obtidos com o iniciador OPY-15. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia; (B) Morretes e (C) São Francisco do Sul.

4.1.3 Análise da variabilidade genética entre amostras de duas populações de *Anopheles bellator* e comparação com *Anopheles cruzii*

Oito iniciadores foram selecionados para comparação entre amostras de *Anopheles bellator* coletadas em Cananéia e Paranaguá, OPA-01, OPA-11, OPG-03, OPY-02, OPY-05, OPY-10, OPY-15 e OPY-16. Para essa espécie, a facilidade de obtenção de iniciadores passíveis de serem utilizados para comparação entre amostras, foi maior que a observada para *Anopheles cruzii*. Durante o processo de seleção de iniciadores, verificou-se que iniciadores que produziam fragmentos altamente polimórficos em *Anopheles cruzii*, geravam perfis mais homogêneos em *Anopheles bellator* (dados não apresentados). Entretanto, para que os resultados obtidos para as duas espécies fossem comparáveis, os mesmos iniciadores (exceto OPG-03) foram utilizados.

Os perfis RAPD obtidos para *Anopheles bellator* também revelaram grande número de fragmentos polimórficos, entretanto maior número de fragmentos foram compartilhados pela maioria ou por todas as amostras. Do total de fragmentos amplificados, 11 foram monomórficos (excluindo OPG-03), com variação de 1 a 3 fragmentos por iniciador. As bandas 2300pb, 2000pb e 1200pb amplificadas com OPY-02; 880pb com OPY-05; 1000pb com OPY-10; 520pb e 470pb com OPY-16; 2500pb, 1300pb e 1200pb com OPA-01; 1700pb com OPA-11 e 1200pb, 800pb e 550pb com OPG-03 foram detectadas em todas as amostras. Seis bandas foram amplificadas em mais de 90% do total de amostras analisado (excluindo OPG-03) (Tabela XI). Fragmentos com baixa frequência nas populações, sendo algumas vezes específicos a determinado indivíduo, também foram observados para *Anopheles bellator*. Nas figuras 23-30 são apresentados os resultados obtidos para amostras coletadas em Cananéia e Paranaguá.

Dentre os fragmentos monomórficos obtidos para *Anopheles bellator*, a banda de 880pb gerada pelo iniciador OPY-05 apresentou peso molecular semelhante ao observado para *Anopheles cruzii*. Contudo, a homologia desses fragmentos só pode ser confirmada através das técnicas de seqüenciamento ou *Southern Blot* (WILKERSON *et al.*, 1993), tendo em vista a possibilidade de que fragmentos de mesmo peso molecular podem apresentar seqüências distintas, principalmente quando diferentes espécies são comparadas (BLACK, 1993).

A partir das bandas amplificadas, 55 foram selecionadas para comparação entre amostras de Cananéia e Paranaguá. A análise de agrupamento através do método UPGMA e utilizando o coeficiente de Jaccard, evidenciou que amostras de Cananéia e Paranaguá são semelhantes e não formam grupos distintos segundo o local de origem. Em *Anopheles bellator*, também não foram observados fragmentos exclusivos a uma determinada população. A similaridade entre as amostras variou entre 67% a 92% (figura 31).

Tabela XI. Fragmentos mais freqüentes entre amostras de *Anopheles bellator* coletadas em Cananéia e Paranaguá, amplificados através de PCR-RAPD.

Iniciador	Peso molecular aproximado	Freqüência entre amostras (%)	
		Cananéia	Paranaguá (Ilha do Mel)
OPY-02	2300pb	100	100
	2000pb	100	100
	1200pb	100	100
	900pb	84,6	100
	700pb	100	95,8
OPY-05	1700pb	92,3	100
	1460pb	92,3	100
	1380pb	88,4	95,8
	880pb	100	100
OPY-10	1300pb	92,3	100
	1000pb	100	100
OPY-15	1900pb+	100	100
OPY-16	770pb	96,1	95,8
	520pb	100	100
	470pb	100	100
OPA-01	2500pb	100	100
	1300pb	100	100
	1200pb	100	100
OPA-11	1700pb	100	100
OPG-03	1200pb	100	100
	800pb	100	100
	650pb	100	95,8
	550pb	100	100

+ complexo de bandas

A amplificação do DNA de *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator* através da PCR-RAPD revelou que estas espécies exibem diferenças quanto a variabilidade genética. Em *Anopheles cruzii* foi observado menor número de bandas compartilhadas pela maioria das amostras, indicando que esta espécie pode apresentar maior variabilidade genética. Essas diferenças, verificadas entre as duas espécies, podem ser resultado do anelamento dos iniciadores em regiões distintas (mais ou menos conservadas) do genoma de cada espécie, do número de amostras analisado e da proximidade entre as populações amostradas.

O maior número de fragmentos conservados em exemplares de *Anopheles bellator* poderia estar relacionado ao menor número de amostras analisado e com a proximidade das localidades amostradas. Contudo, as amostras de *Anopheles cruzii* também foram obtidas em áreas próximas e mesmo assim a espécie apresentou-se mais polimórfica. A análise de maior número de amostras de *Anopheles bellator*, deverá revelar outros polimorfismos, mas características biológicas próprias da espécie também podem estar associadas a maior quantidade de fragmentos comuns entre indivíduos.

Estudos dos padrões de bandas em cromossomos politênicos indicam que populações naturais de *Anopheles cruzii* apresentam maior variabilidade genética quando comparadas as populações de *Anopheles bellator* coletadas em mesmo local. RAMIREZ & DESSEN (1996, 1994) verificaram que *Anopheles cruzii* apresenta maior número de inversões cromossômicas que *Anopheles bellator*, e inferem que tal diferença possa estar relacionada a diversidade de microhabitats presentes na área de distribuição da espécie e que são por ela explorados.

A maioria das espécies de *Kerteszia* desenvolve-se em bromélias, mas exibe preferências distintas quanto ao tamanho e ao local onde as plantas encontram-se fixas. *Anopheles bellator* é encontrada mais frequentemente em bromélias capazes de armazenar grandes volumes de água e situadas em locais ensolarados, enquanto *Anopheles cruzii* pode explorar bromélias com capacidades variáveis (5-2000ml) e que ocupam diferentes microhabitats. Além disso, na região sul do Brasil, *Anopheles cruzii* pode ser encontrada em

áreas situadas desde o nível do mar até 600 metros de altitude, enquanto *Anopheles bellator* é encontrada preferencialmente em formações de restinga próximas a orla marítima (VELOSO *et al*, 1956 e ARAGÃO, 1968b). Desta forma, é possível que espécies que exploram maior variedade de habitats apresentem maior variabilidade genética, pois devem responder a maior número de estímulos ambientais.

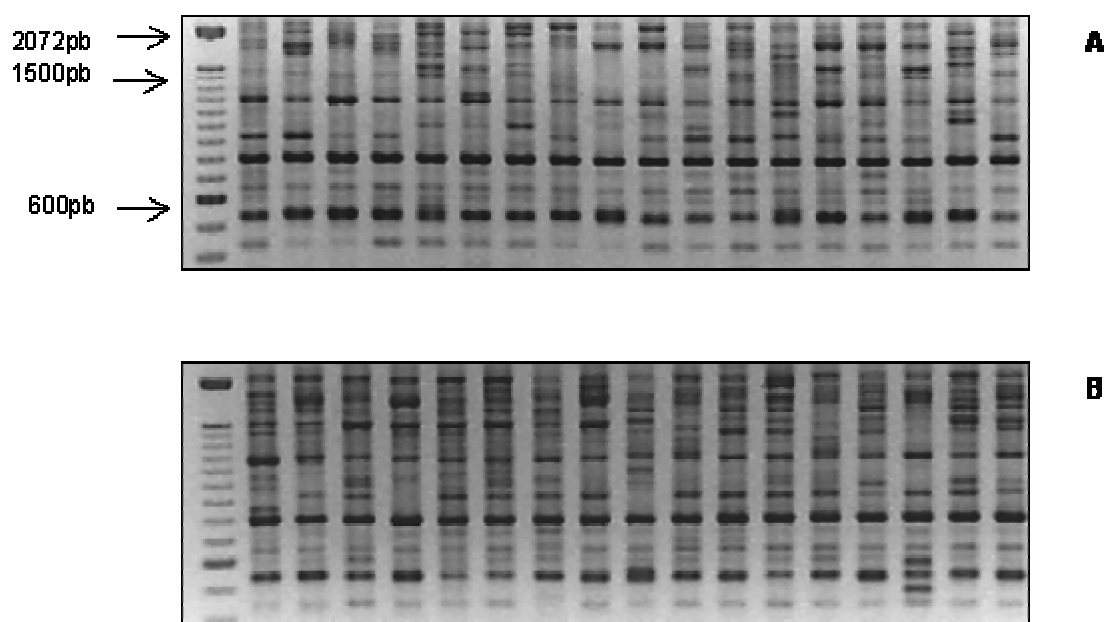


Figura 23. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPG-03. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá

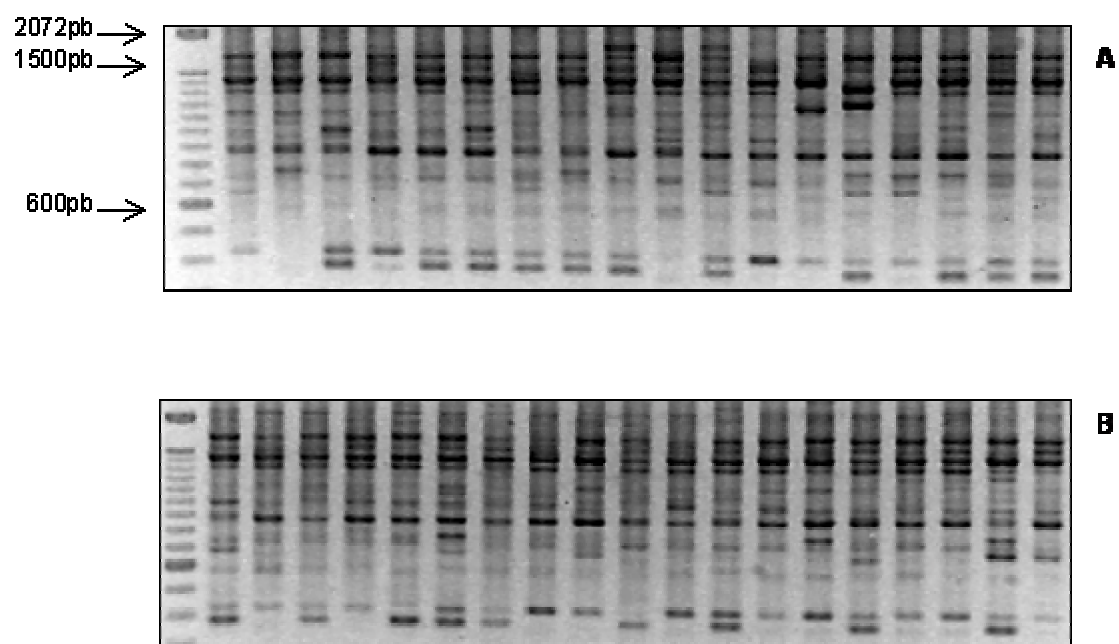


Figura 24. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPY-05. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

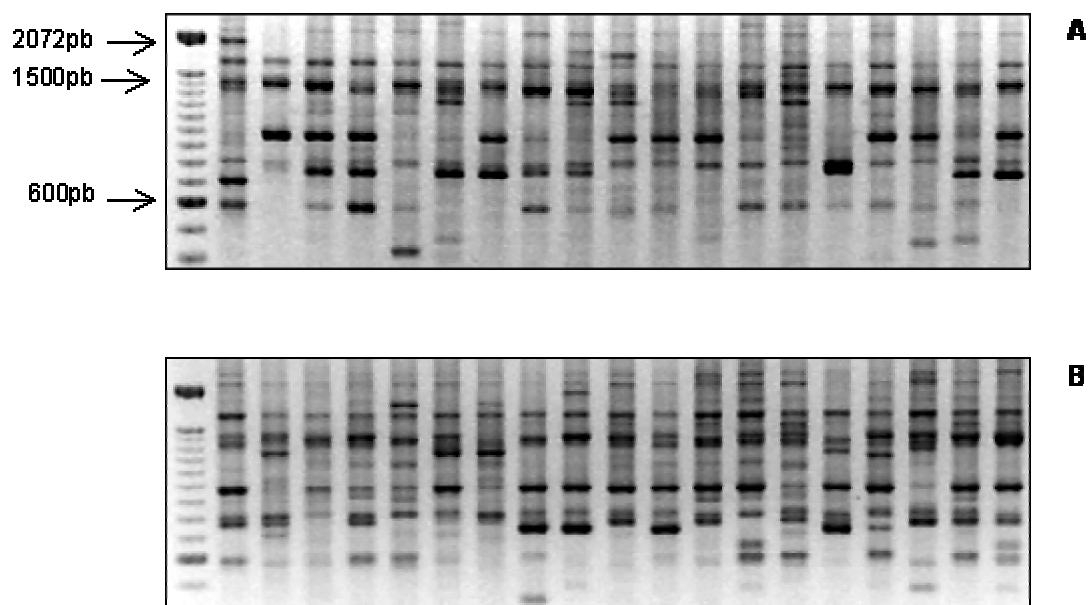


Figura 25. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPA-11. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

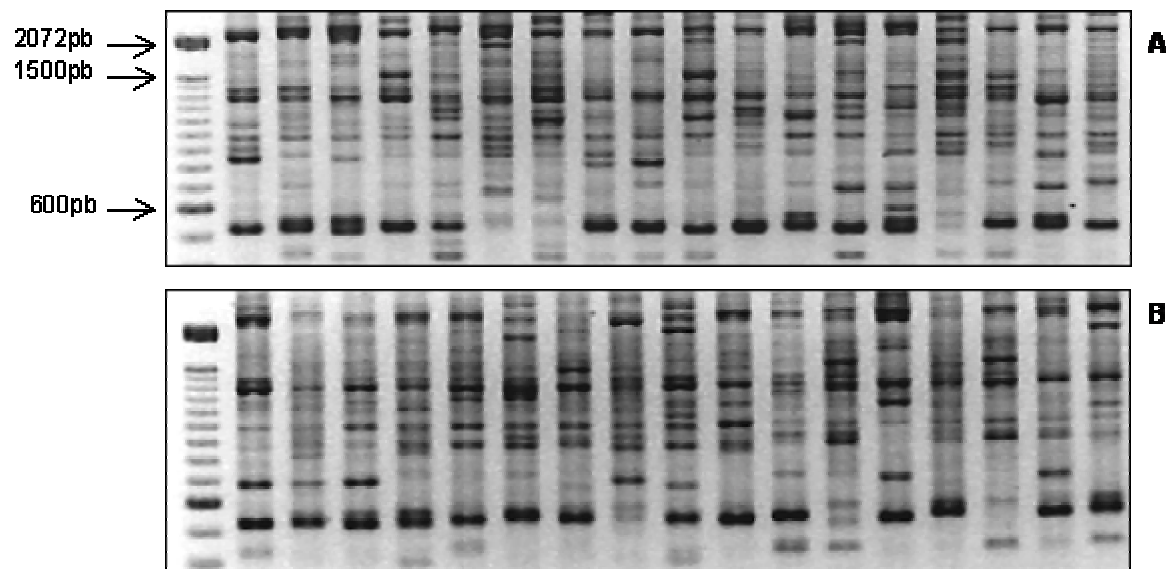


Figura 26. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPY-10. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

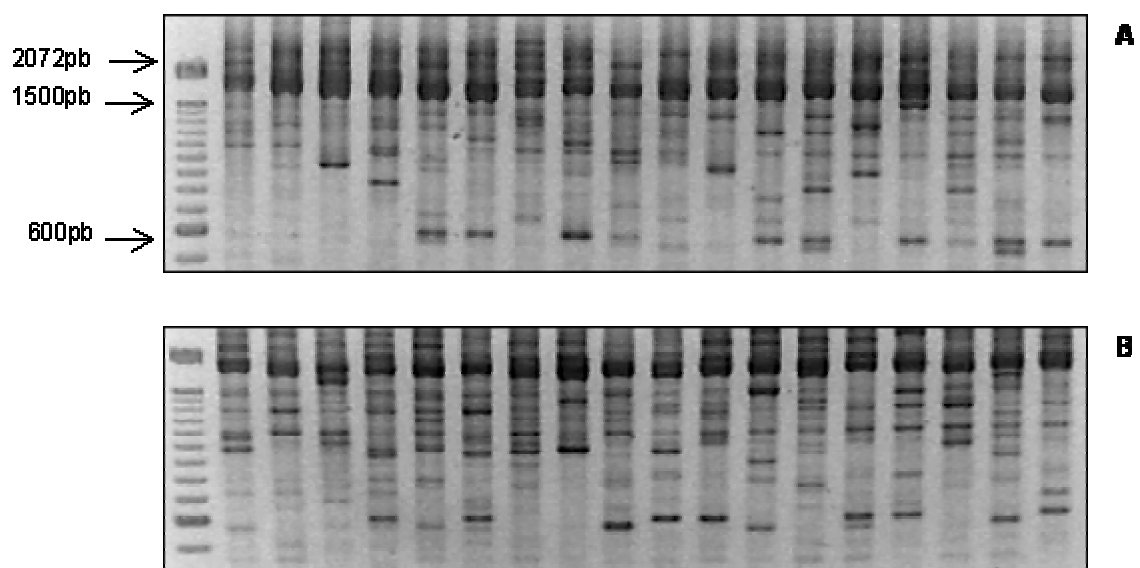


Figura 27. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPY-15. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

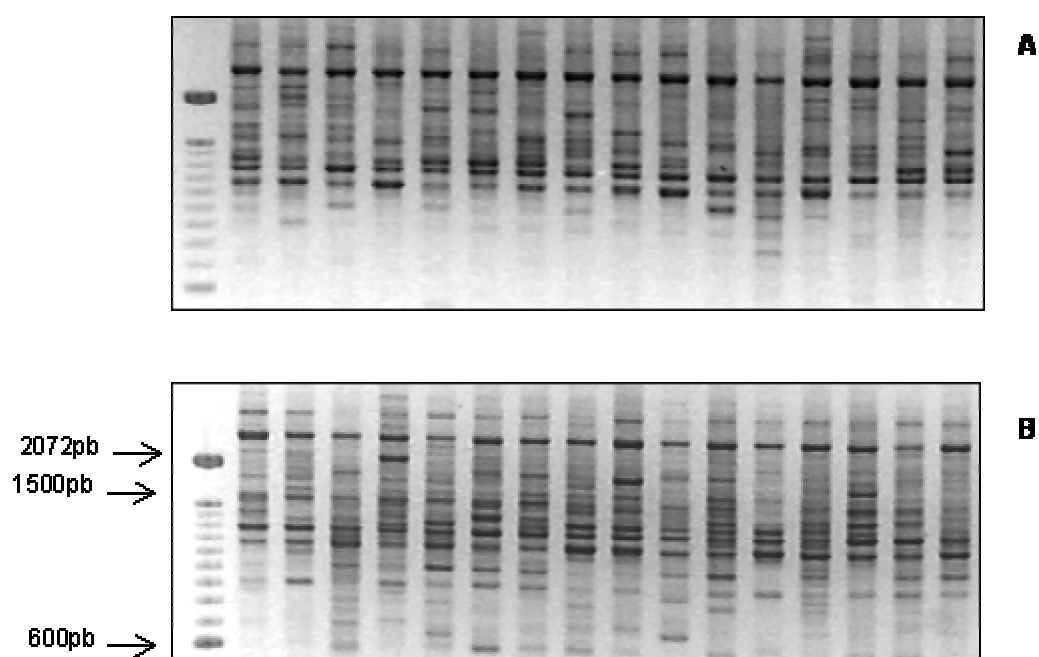


Figura 28. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPA-01. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

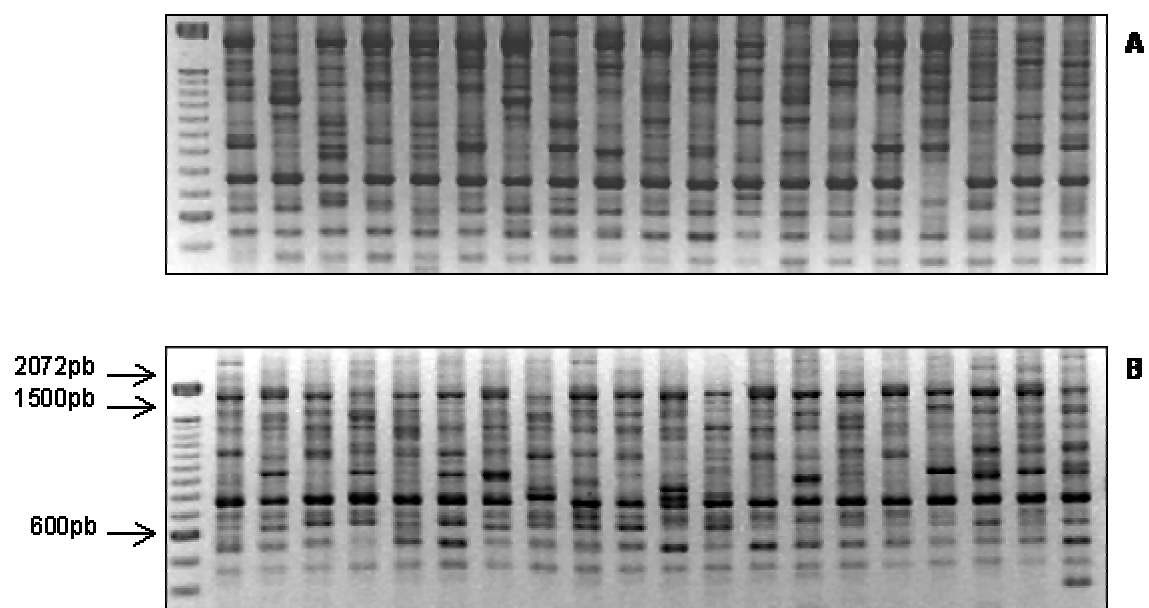


Figura 29. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPY-16. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

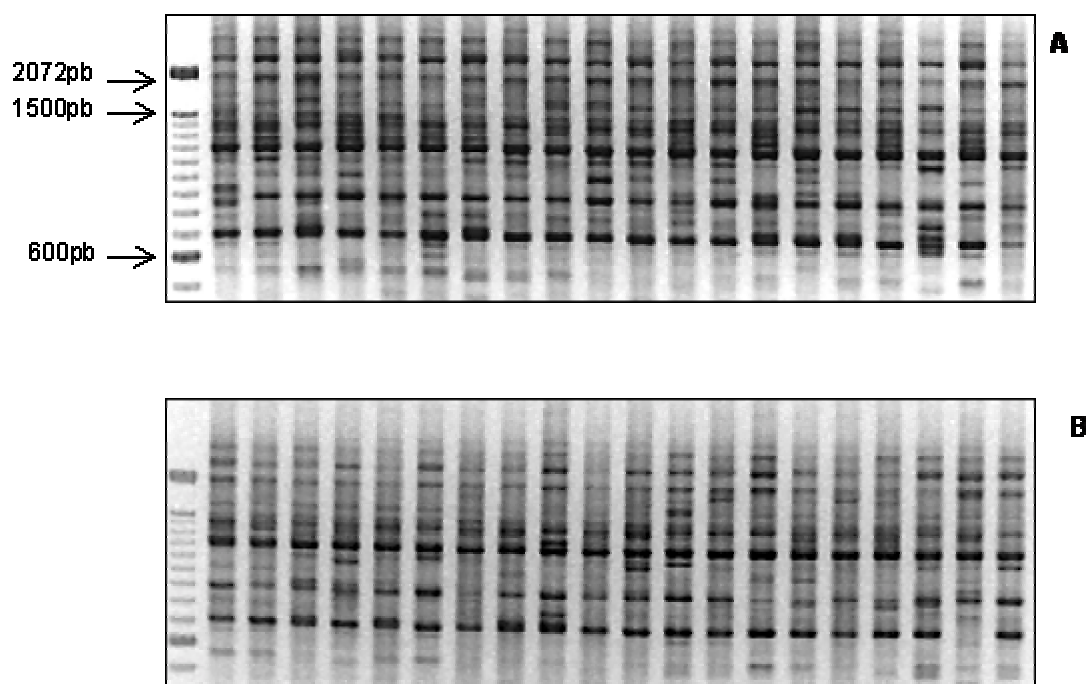


Figura 30. Padrão dos fragmentos amplificados através de PCR-RAPD de indivíduos de *Anopheles bellator*, obtidos com o iniciador OPY-02. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen); (A) Cananéia e (B) Paranaguá.

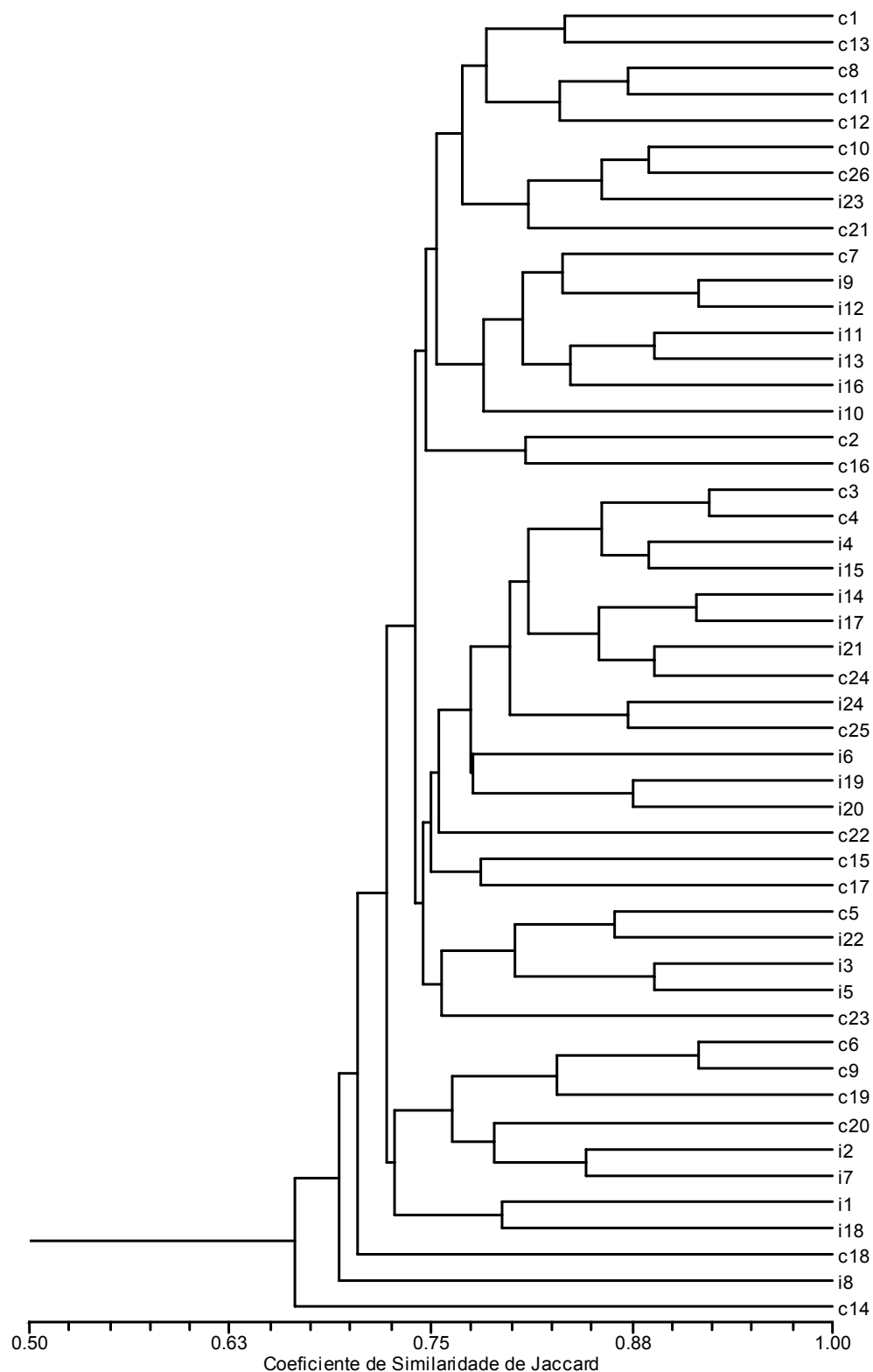


Figura 31. Dendrograma obtido a partir de fragmentos gerados pela PCR-RAPD, utilizando o método de agrupamento UPGMA e coeficiente de similaridade de Jaccard, em indivíduos de *Anopheles bellator* de Cananéia (Estado de São Paulo) (c) e Paranaguá (Ilha do Mel, Estado do Paraná) (i).

4.1.4 Comparação entre os perfis obtidos para *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* e possibilidade de utilização da técnica PCR-RAPD para identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*

Em uma segunda análise, exemplares de *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* foram avaliados de forma conjunta utilizando o método UPGMA e a distância de NEI (1972), com auxílio do programa POPGENE. Para evitar problemas quanto a homologia das bandas a serem comparadas, foram utilizadas somente aquelas mais freqüentes entre amostras de cada espécie. Também foram analisadas as bandas compartilhadas por duas ou mais espécies, e que se apresentaram consistentes (exemplo OPY05-880pb).

A maioria dos iniciadores utilizados amplificaram perfis distintos para *Anopheles cruzii*, *Anopheles homunculus* e *Anopheles bellator*, permitindo a pronta identificação. Para melhor visualização desses resultados, nas figuras 32 a 38 são apresentados de forma comparativa os perfis obtidos para as espécies analisadas.

Quarenta fragmentos foram selecionados e utilizados para construção da matriz binária. A análise de agrupamento mostrou que as diferentes espécies podem ser caracterizadas através da utilização de fragmentos amplificados pela PCR-RAPD. As amostras de *Anopheles bellator* apresentaram-se mais distintas daquelas pertencentes a *Anopheles homunculus* e *Anopheles cruzii*. O dendrograma gerado a partir da análise de similaridade e agrupamento está representado na figura 39.

Embora, *Anopheles bellator* possa ser diferenciada das demais através de caracteres morfológicos, sua utilização no presente estudo justifica-se pela presença de fragmentos com pesos moleculares próximos aos obtidos para as outras espécies, e que portanto, poderiam ser erroneamente utilizados como marcadores espécie-específicos. Já, *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* são semelhantes morfológicamente e a identificação

específica nem sempre é obtida através dos caracteres morfológicos presentes na fêmea adulta e nos estágios imaturos.

Cabe ressaltar que, *Anopheles homunculus* apresenta distribuição descontínua, ocorrendo em Trinidad e Tobago, Bolívia (Cochabamba), Venezuela (Bolívar, Monaguas, Tachira, Trujillo), Colômbia (Meta) e Brasil (São Paulo, Paraná, Santa Catarina). Não existem evidências concretas sobre a ampla área de distribuição intermediária às localidades onde já foi encontrada (FORATTINI, 2002), e por isso não há garantias de que todos os registros referem-se a uma mesma espécie. Assim, os perfis RAPD aqui obtidos podem corresponder apenas aos exemplares da região estudada.

A amplificação do DNA de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* com os iniciadores OPY-05 e OPY-10, forneceu padrões eletroforéticos claramente distintos. Tendo em vista, possíveis problemas quanto a reprodutibilidade da técnica em outros laboratório e utilizando diferentes reagentes, esses iniciadores podem ser empregados com maior sucesso na identificação específica, pois geraram perfis diferentes para as duas espécies, com ausência de bandas compartilhadas. Além dos iniciadores aqui indicados, outros podem ser empregados.

Os demais iniciadores (OPA-11, OPY-16, OPY-15 e OPA-01) forneceram fragmentos muito variáveis em *Anopheles cruzii*, dificultando a identificação quando um grande número de amostras é analisado.

Uma das desvantagem da técnica PCR-RAPD é a produção de elevado número de polimorfismos em populações naturais, principalmente quando grande número de indivíduos são estudados. WILKERSON *et al.* (1995a,b) apontam que a presença de fragmentos monomórficos em determinada espécie e sua ausência em espécies relacionadas, pode ser utilizada como caráter taxonômico. Entretanto, a obtenção de fragmentos fixados em todas as populações de uma espécie nem sempre é possível. Estes autores identificaram quatro espécies do complexo *Anopheles albitarsis* através de marcadores RAPD e consideram a técnica efetiva para a identificação de espécies que constituem complexos. Porém, também

verificaram variação quanto a frequência de fragmentos considerados diagnósticos. Este problema pode ser contornado com a utilização de mais de um iniciador, ou seja, através da comparação de perfis obtidos para diferentes regiões do genoma.

A dificuldade encontrada para identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*, através de caracteres morfológicos, pode ser contornada com obtenção de outros caracteres taxonômicos gerados por metodologias alternativas, como por exemplo a PCR-RAPD. Essa técnica apresenta a vantagem de permitir a utilização de indivíduos em qualquer estágio de desenvolvimento e de qualquer sexo.

Devido ao grande número de fragmentos amplificados e ao elevado número de iniciadores disponíveis para o uso, a PCR-RAPD fornece um arsenal de marcadores que podem ser utilizados na identificação específica (RAICH *et al.*, 1993). Polimorfismos podem ser detectados em organismos proximamente relacionados, tais como espécies que constituem complexos, indivíduos de diferentes populações ou indivíduos de uma mesma população (BOWDITCH *et al.*, 1993).

Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para identificação de outras espécies de insetos. LOUNIBOS *et al.* (1998) verificaram que marcadores RAPD suportam a existência de *Anopheles dunhami* Causey como entidade genética distinta de *Anopheles trinkae* Faran. SKODA *et al.* (2002) através da PCR-RAPD obtiveram perfis distintos para *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), que podem ser utilizados como caracteres taxonômicos. BLACK *et al.* (1992) utilizaram a técnica para amplificar o DNA de vários grupos de Arthropoda, especialmente de Aedini (Diptera: Culicidae), Cecidomyiidae (Diptera), Cicadellidae (Hemiptera) e Tetranychidae (Acari), e destacam que devido a capacidade da técnica em gerar padrões de bandas espécie-específicos, esta pode ser utilizada para a identificação específica em grupos onde os caracteres morfológicos presentes nos estágios adulto e imaturo não permitem rápida identificação. A utilização de diferentes iniciadores pode gerar caracteres moleculares que são diagnósticos para diferentes níveis taxonômicos (gêneros, espécies ou populações) (HADRYIS *et al.*, 1992).

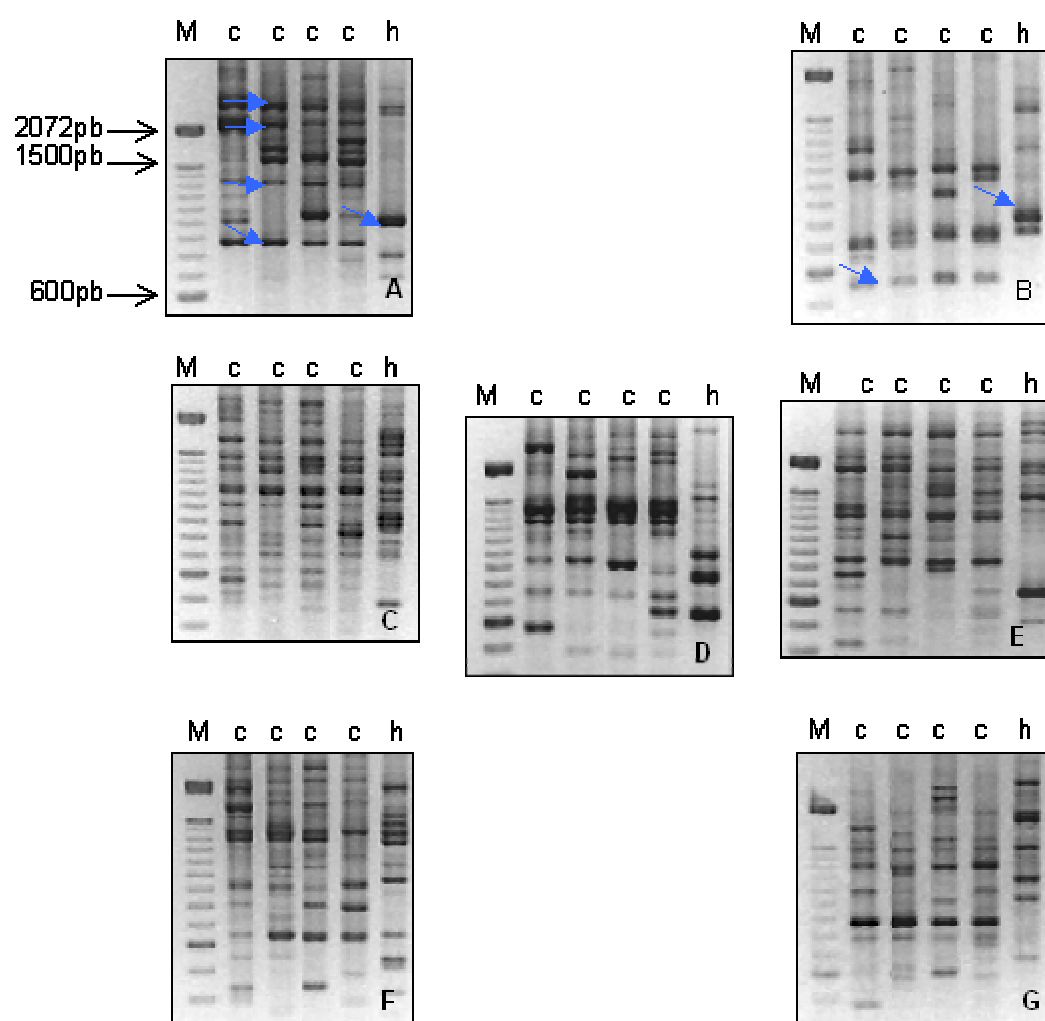


Figura 32. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (c) e *Anopheles homunculus* (h), obtidos com os iniciadores: (A) OPY-05; (B) OPY-10; (C) OPY-02; (D) OPA-11; (E) OPY-15; (F) OPY-16 e (G) OPA-01. (M) Marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Seta indicam marcadores (somente em iniciadores passíveis de serem utilizados para identificação específica - ver texto).

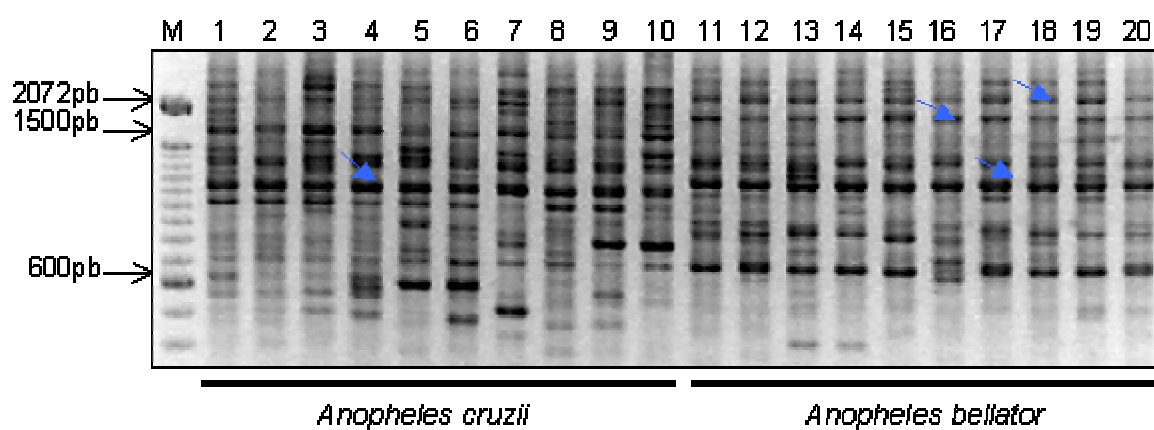


Figura 33. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (1-10) e *Anopheles bellator* (11-20), obtidos com o iniciador OPY-02. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.

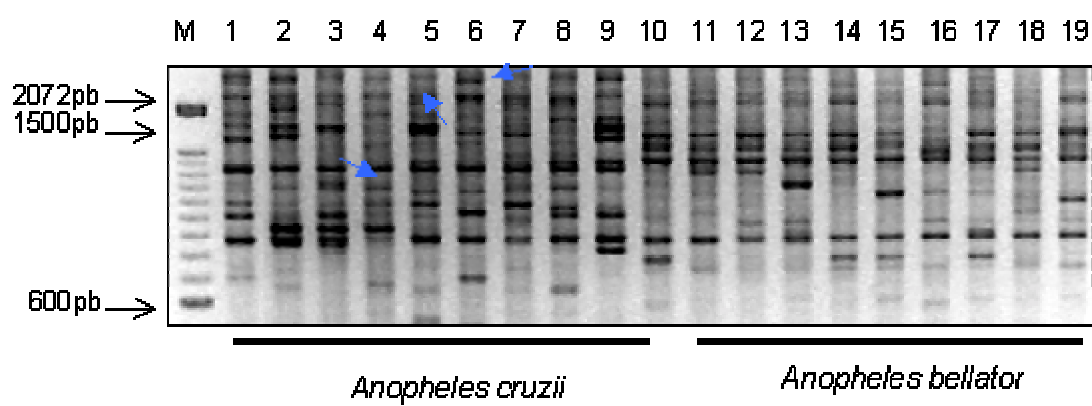


Figura 34. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (1-9) e *Anopheles bellator* (10-19), obtidos com o iniciador OPY-05. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.

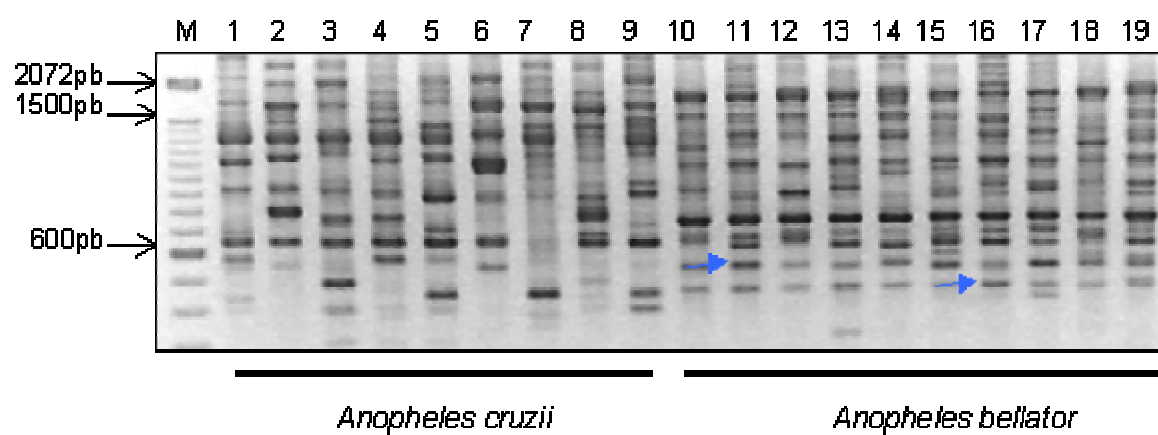


Figura 35. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (1-9) e *Anopheles bellator* (10-19), obtidos com o iniciador OPY-16. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.

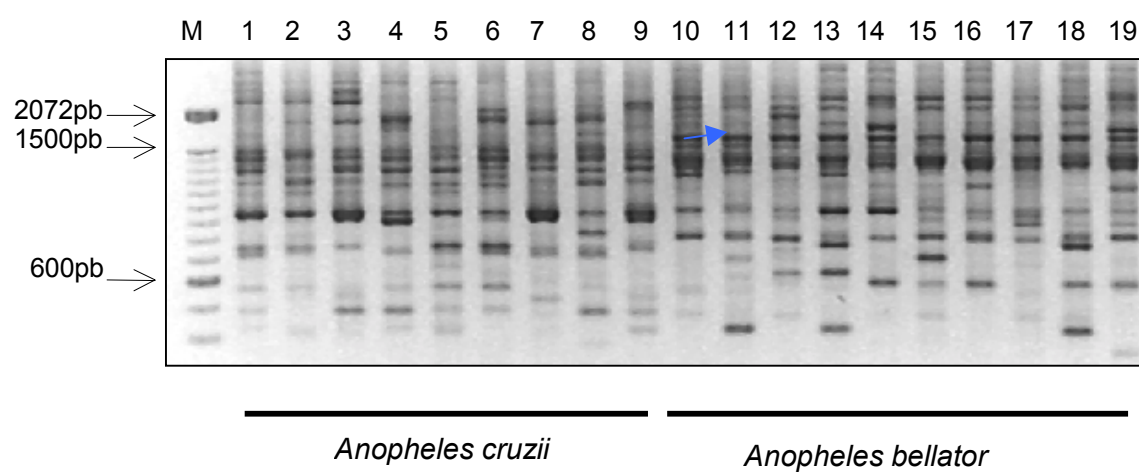


Figura 36. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (1-10) e *Anopheles bellator* (11-19), obtidos com o iniciador OPA-11. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.

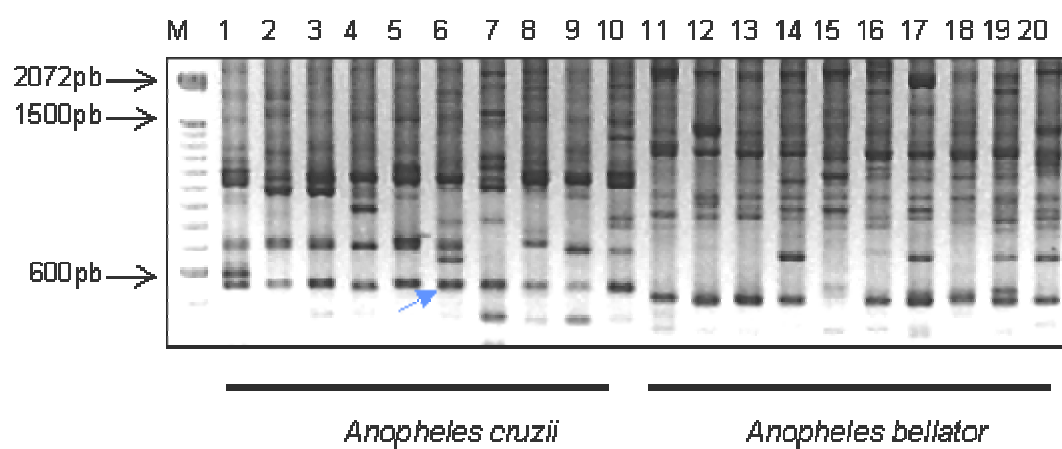


Figura 37. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (1-10) e *Anopheles bellator* (11-20), obtidos com o iniciador OPY-10. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.

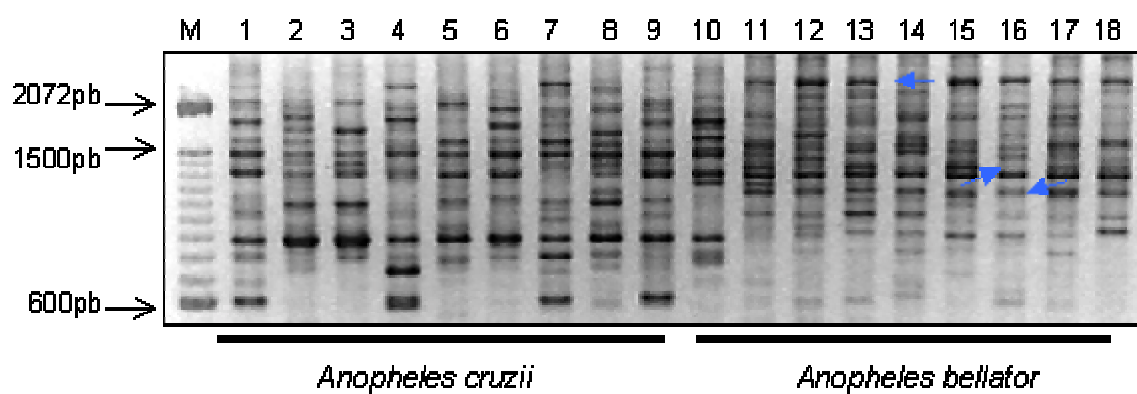


Figura 38. Comparação entre os fragmentos amplificados através de PCR-RAPD para indivíduos de *Anopheles cruzii* (1-10) e *Anopheles bellator* (11-18), obtidos com o iniciador OPA-01. (M) marcador 100pb DNA Ladder (Invitrogen). Setas indicam marcadores.

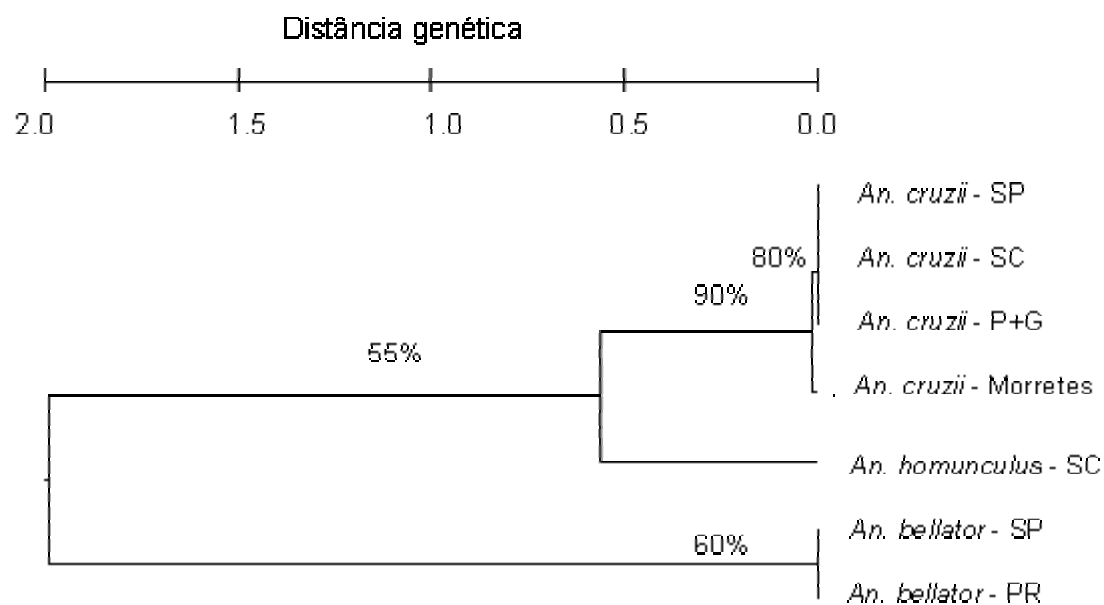


Figura 39. Dendrograma construído a partir das bandas mais freqüentes entre amostras de *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*, obtidas através da técnica PCR-RAPD. Agrupamento através do método UPGMA e utilizando distância de NEI (1972).

4.2 Análise da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S através de PCR-RFLP

Embora os resultados obtidos através da técnica PCR-RAPD não apontem a existência de mais de uma entidade genética em *Anopheles cruzii*, duas evidências sugerem a presença de mais de uma espécie dentro desse táxon: polimorfismos de inversões (RAMIREZ & DESSEN, 2000a, b) e padrões isoenzimáticos (CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004), as quais poderiam justificar a dificuldade em se detectar fragmentos comuns a todos os exemplares analisados através da técnica PCR-RAPD. Tendo em vista essa possibilidade, amostras foram selecionadas e utilizadas para verificar a presença de polimorfismos de restrição na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*.

Além disso, amostras de *Anopheles homunculus* também foram utilizadas para verificar possíveis polimorfismos nessa região, que possam ser utilizados como caracteres taxonômicos para separação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*. Amostras de *Anopheles bellator* foram incluídas para comparação com estas espécies.

4.2.1 Análise dos perfis de restrição da região ITS2 e parte dos genes 28S e 5.8S de *Anopheles cruzii*

A amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* resultou em fragmento de aproximadamente 490pb, diferindo das seqüências disponíveis no GenBank para esta espécie, as quais apresentam 429-430pb. Esta diferença quanto ao peso molecular está relacionada a ausência das regiões de anelamento dos iniciadores (58pb) nas seqüências contidas no GenBank (Figura 40).

Após tratamento com as enzimas *HaeIII*, *HhaI*, *HincII*, *HinfII*, *NruI*, *BstUI* e *Sau96I*, *TaqI*, a clivagem dos produtos de amplificação produziu 1-4 fragmentos detectáveis em gel

de agarose 2%. As diferenças observadas quanto ao peso molecular do fragmento intacto e a soma daqueles observados em gel, deve-se a presença de fragmentos de mesmo peso migrando na mesma posição (co-migração) e que por isso não puderam ser diferenciados através da eletroforese em gel de agarose 2% ou pela presença de fragmentos muito pequenos não detectáveis em gel de agarose 2%.

Nas figuras de 42 a 49A, são apresentadas, de forma aproximada, as posições dos sítios de restrição estimadas a partir das seqüências (AF417739 e AF035227) e os pesos moleculares dos fragmentos após clivagem (excluindo iniciadores), para a região ITS2 e parte dos genes 28S e 5.8S de *Anopheles cruzii*. Para comparação com os resultados apresentados nas figuras de 42 a 49B devem ser acrescentados a seqüência dos iniciadores (58pb) às extremidades da seqüência.

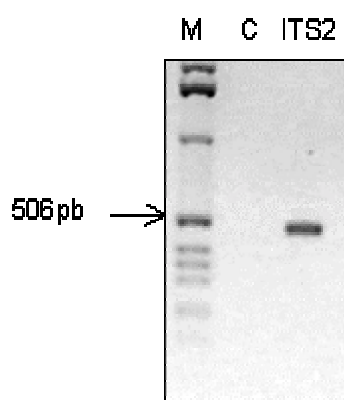


Figura 40. Produto de amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*. (M) Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen), (C) Controle negativo.

As oito endonucleases utilizadas produziram fragmentos de mesmo peso molecular em todas as amostras identificadas como *Anopheles cruzii*, não sendo detectados polimorfismos intraespecíficos. Entretanto, quando os perfis de restrição obtidos foram comparados com as duas sequências obtidas por MALLAFRONTÉ *et al.* (1997), verificou-se que as amostras aqui analisadas apresentam algumas diferenças.

MALLAFRONTÉ *et al.* (1997) ao analisarem as seqüências e o perfil de restrição da região ITS2 de *Anopheles cruzii* de localidades do Estado de São Paulo, verificaram a presença de dois polimorfismos. O primeiro referente a ausência do sítio de restrição da endonuclease *NruI* em indivíduos coletados em Peruíbe, devido a ausência de duas bases (AG) nas posições 135/136 da região ITS2. O segundo polimorfismo, embora não tenha sido destacado pelos autores, refere-se a três nucleotídeos extras (CGC) na seqüência das amostras de Peruíbe, os quais constituem parte do sítio de restrição da enzima *HhaI* e formam uma seqüência repetitiva (GC₃).

As amostras aqui analisadas apresentam sítio de restrição para *NruI*, semelhante ao observado por MALLAFRONTÉ *et al.* (1997) para a localidade de Juquiazinho (Município de Juquitiba). Porém, quando submetidas a restrição com *HhaI*, geram fragmentos com pesos moleculares mais compatíveis aos esperados para a população de Peruíbe (60,162,116,72 e 78), do que aos esperados para Juquiazinho (60,277, 72 e 78). Análises preliminares (seqüenciamento) de algumas das amostras aqui utilizadas corroboram os resultados obtidos com essas enzimas (Figura 41) (metodologia não descrita). Amostras coletadas nos estados de Santa Catarina, São Paulo e Paraná possuem sítios de restrição das duas enzimas e são diferentes daquelas obtidas para Juquiazinho e Peruíbe por MALLAFRONTÉ *et al.* (1997). Desta forma, as amostras aqui analisadas e as duas seqüências disponíveis no GenBank representam pelos menos três “tipos” distintos de ITS2.

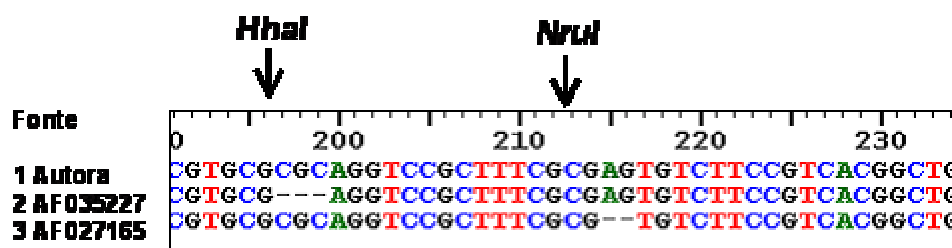


Figura 41. Polimorfismos na seqüência da região ITS2 de *Anopheles cruzii*. 1. São Francisco do Sul (autora), Juquiazinho (Município de Juquitiba) (AF035227) e Peruíbe (AF027165) [MALLAFRONTÉ *et al.*, 1997].

Com base em padrões de bandas do cromossomo X, RAMIREZ & DESSEN (2000a,b) reconhecem pelo menos três espécies crípticas em *Anopheles cruzii*, com frequência e ocorrência nas seguintes localidades:

- padrão A em Boracéia (86%), Juquitiba (97%), Guaratuba (87%), Peruíbe (100%) e Cananéia (4%),
- padrão B em São Francisco do Sul (100%), Guaratuba (13%) e Cananéia (96%);
- padrão C em Boracéia (14%) e Juquitiba (3%).

A partir dos resultados aqui obtidos e daqueles apresentados por RAMIREZ & DESSEN (2000a, b) e MALLAFRONTÉ *et al.* (1997), duas questões podem ser levantadas: Os polimorfismos na região ITS2 podem ser correlacionados aos padrões cromossômicos? E como?

Uma das possibilidades é:

- a. seqüência 1 pode corresponder ao padrão B (encontrado em 100% das amostras de São Francisco do Sul - RAMIREZ & DESSEN 2000a, b);
- b. seqüência 2 pode corresponder ao padrão A (encontrado em 100% das amostras de Peruíbe - RAMIREZ & DESSEN 2000a, b);
- c. seqüência 3 pode corresponder ao padrão C (encontrado em 3% das amostras de Juquitiba - RAMIREZ & DESSEN 2000a, b).

Para as localidades de São Francisco do Sul e Peruíbe, as correlações podem ser feitas com maior segurança, tendo em vista que todas as amostras de cada um desses locais apresentaram apenas um padrão cromossômico, A e B, respectivamente. Entretanto, o número de indivíduos de Juquitiba que compartilham o padrão C é pequeno (3%), e portanto a correlação ITS2-padrão cromossômico torna-se um tanto duvidosa. A probabilidade de que a seqüência disponível para Juquitiba esteja relacionada ao padrão A é maior. Nesse caso os polimorfismos observados na região ITS2 não poderiam ser correlacionados e também não representariam bons caracteres taxonômicos.

A polimorfismo observado entre as amostras aqui analisadas e a seqüência de Juquiazinho constituem um seqüência repetitiva, as quais são comuns na região ITS2 de *Anopheles*. Estas podem variar quanto ao tipo (ACA, GC, CA, GT, etc.) e freqüência entre diferentes espécies crípticas ou formas cromossômicas (XU & QU, 1997; CORNELL *et al.*, 1996; MUKABAYIRE *et al.*, 1999) e têm sido observadas, por exemplo, entre as espécies A e D do complexo *Anopheles dirus* (XU & QU, 1997) e no complexo *Anopheles quadrimaculatus* (CORNELL *et al.*, 1996). Segundo XU & QU (1997) e WESSON *et al.* (1992) estas seqüências podem ser originadas pelo processo de escorregamento (*slippage*) da DNA polimerase durante o processo de replicação.

MUKABAYIRE *et al.* (1999) ao analisarem diferentes formas cromossômicas de *Anopheles funestus* Giles verificaram dois polimorfismos na seqüência da região ITS2, compartilhados por mais de uma forma cromossômica. Um deles representado por uma transição (A→G) e o outro pela inserção de uma unidade (GT) em uma seqüência repetitiva

[(GT)₇]. Essas diferenças observadas na região ITS2 e outras detectadas no gene *cyt-b* (mtDNA) não suportam a existência de espécies isoladas. Segundo esses autores, se *Anopheles funestus* é composto por múltiplas espécies, o aparente conflito entre evidências moleculares e citogenéticas, pode ser resolvido se for assumido que o processo de especiação é recente. Assim, os diferentes haplótipos (ITS2 e *cyt-b*) devem ser compartilhados, não por causa do fluxo gênico, mas por causa da retenção de polimorfismos ancestrais e do tempo insuficiente para que mutações diagnósticas possam ser fixadas. A falta de suporte molecular para heterogeneidades observadas dentro de populações ou até mesmo entre espécies, detectadas através dos níveis comportamentais ou citogenéticos, podem simplesmente refletir as taxas de mudanças surpreendentemente rápidas nesses níveis em anofelíneos (MUKABAYIRE *et. al.* (1999).

As observações feitas por CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) apontam ainda para outra possibilidade, onde populações de *Anopheles cruzii* dos estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro representariam uma espécie. Estes autores ao analisarem o fluxo gênico entre populações de Florianópolis (SC), Cananéia (SP), Nova Iguaçu (RJ) e Jaguaripe (BA), concluíram que apenas a população do litoral nordestino constitui uma população isolada ou uma espécie diferente, e que os indivíduos das demais localidades não apresentam padrões isoenzimáticos diferentes que indiquem a presença de espécies distintas como sugerido por RAMIREZ & DESSEN (2000a, b).

Cabe ressaltar que CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) também analisaram amostras de Cananéia, onde podem ser encontrados dois padrões cromossômicos (A e B), mas não obtiveram evidências de duas espécies nessa localidade. Uma possibilidade para a não detecção de diferentes padrões enzimáticos poderia ser a baixa frequência do tipo cromossômico A nessa localidade, presente em apenas 4% das amostras analisadas por RAMIREZ & DESSEN (2000a,b). Porém, a hipótese de CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) não pode ser descartada, pois estes autores utilizaram metodologias diferentes. Além disso, apesar de ocorrer em áreas do litoral

nordestino, *Anopheles cruzii* não é considerada vetora de *Plasmodium* nessa região (RACHOU, 1952; CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004), o que poderia corroborar os resultados obtidos por CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004). Assim, se as populações presentes nas regiões sul e sudeste constituem uma espécie, tanto os polimorfismos observados na região ITS2 quanto os diferentes padrões cromossômicos expressariam apenas a diversidade genética de *Anopheles cruzii*, sem significado taxonômico.

Variabilidade intraespecífica na região ITS2 tem sido observada em espécies de *Anopheles* neotropicais. Ao analisarem as seqüências da região ITS2 de indivíduos de *Anopheles darlingi* coletados em várias regiões da América do Sul e Belize, MANGUIN *et al.* (1999) também verificaram variabilidade intraespecífica representada pela inserção de três nucleotídeos (CCC) na seqüência do ITS2 de amostras da América do Sul. MARRELLI *et al.* (1999) verificaram diferenças intraindividuais e intraespecíficas na região ITS2 de *Anopheles oswaldoi* s.l. procedentes de Rondônia, Acre e Amazonas.

As informações obtidas, até o momento, através de técnicas citogenéticas e moleculares ainda são conflitantes, mas indicam que o táxon *Anopheles cruzii* é altamente polimórfico e que possivelmente constitui complexo de espécies. Porém, ainda não há consenso quanto a distribuição geográfica de suas espécies, nem tão pouco quanto as técnicas que podem ser empregadas para separá-las corretamente.

Estudos envolvendo a determinação de caracteres (morfológicos, genéticos ou bioquímicos) entre espécies de *Anopheles* são algumas vezes limitados a pequenas áreas de distribuição da espécie. Consequentemente, em alguns casos estes caracteres são posteriormente considerados não informativos quando aplicados em toda a distribuição geográfica (FRITZ *et al.*, 1991; COETZEE *et al.*, 1993; FRITZ *et al.*, 1995). Além disso, inversões cromossômicas e marcadores moleculares nem sempre são congruentes para discriminação entre espécies pertencentes a complexos dentro do gênero *Anopheles* (DUSFOUR *et al.*, 2004).

Os resultados aqui obtidos através da RFLP-PCR não apontam a presença de mais de uma espécie do complexo *Anopheles cruzii* entre as amostras analisadas, mas indicam que a sequência da região ITS2 dos indivíduos analisados são diferentes daquelas disponíveis no GenBank. Por isso, a possibilidade de existência de um complexo de espécies em *Anopheles cruzii* merece novas investigações que envolvam maior número de indivíduos, áreas e metodologias, e que permitam estabelecer relações mais claras entre os trabalhos já realizados. Sequências da região ITS2 de maior número de amostras devem ser obtidas para determinar se os polimorfismos podem ser encontrados em outras áreas ou se estão limitados a certas regiões, e para verificar se os padrões cromossômicos definidos por RAMIREZ & DESSEN (2000a, b) podem ser correlacionados, efetivamente, com polimorfismos fixados na região ITS2 e/ou em outras regiões ou genes.

A correta identificação e o conhecimento do relacionamento genético dentro e entre populações vetoras têm importante papel em programas de controle da malária (FREITAS-SIBAJEV *et al.*, 1995).

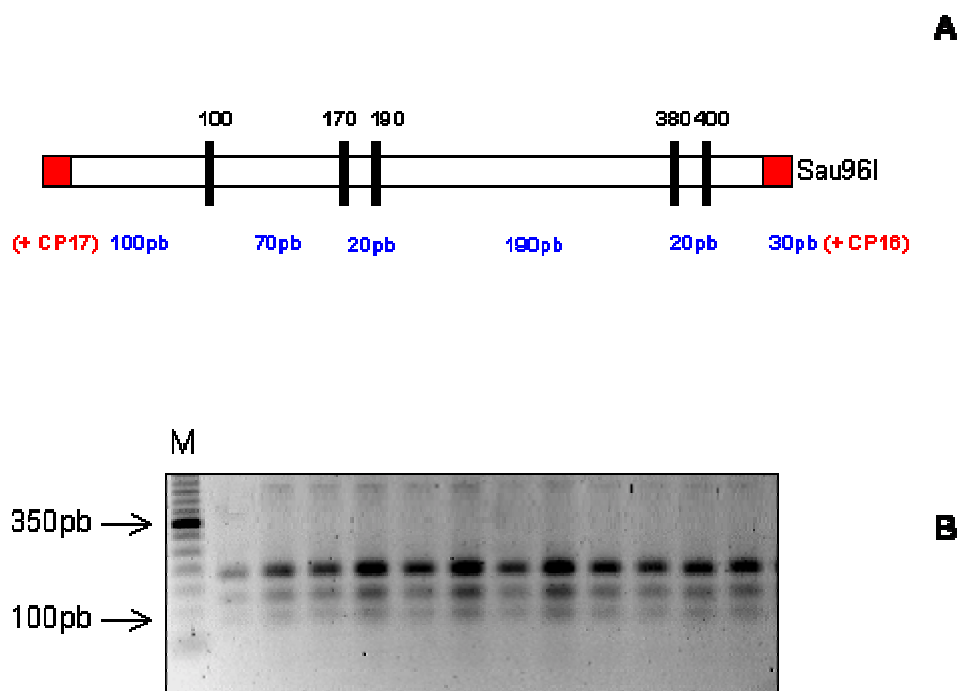


Figura 42. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com **Sau96I**. (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).

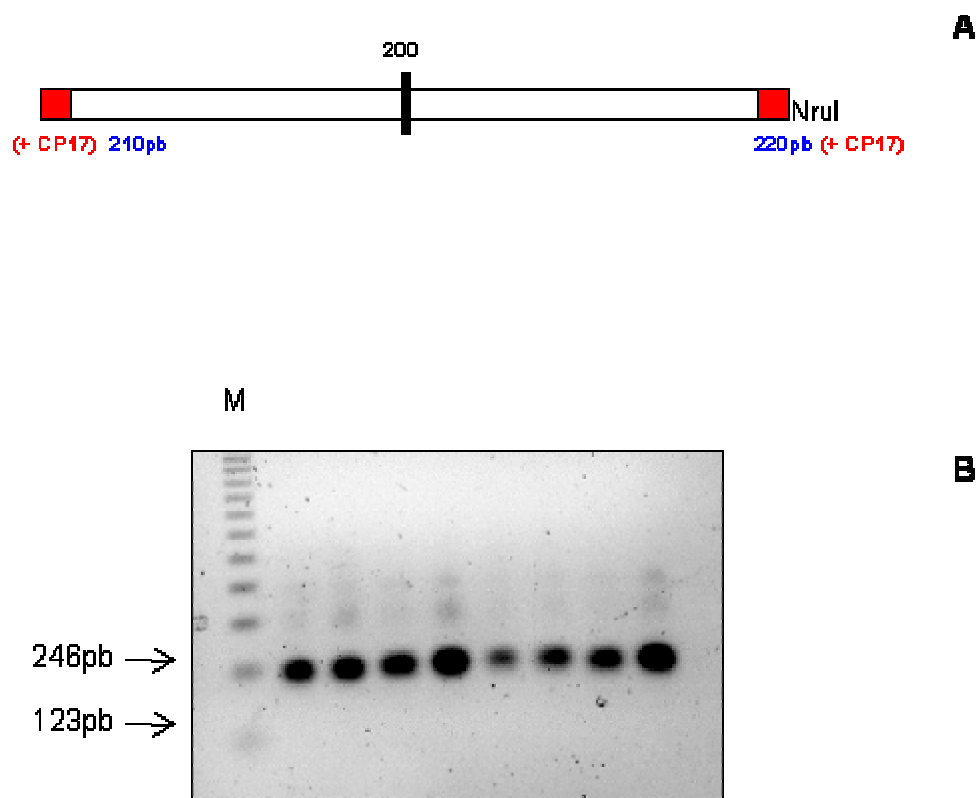


Figura 43. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease **Nrul**. (M) marcador 123pb DNA Ladder (Invitrogen).

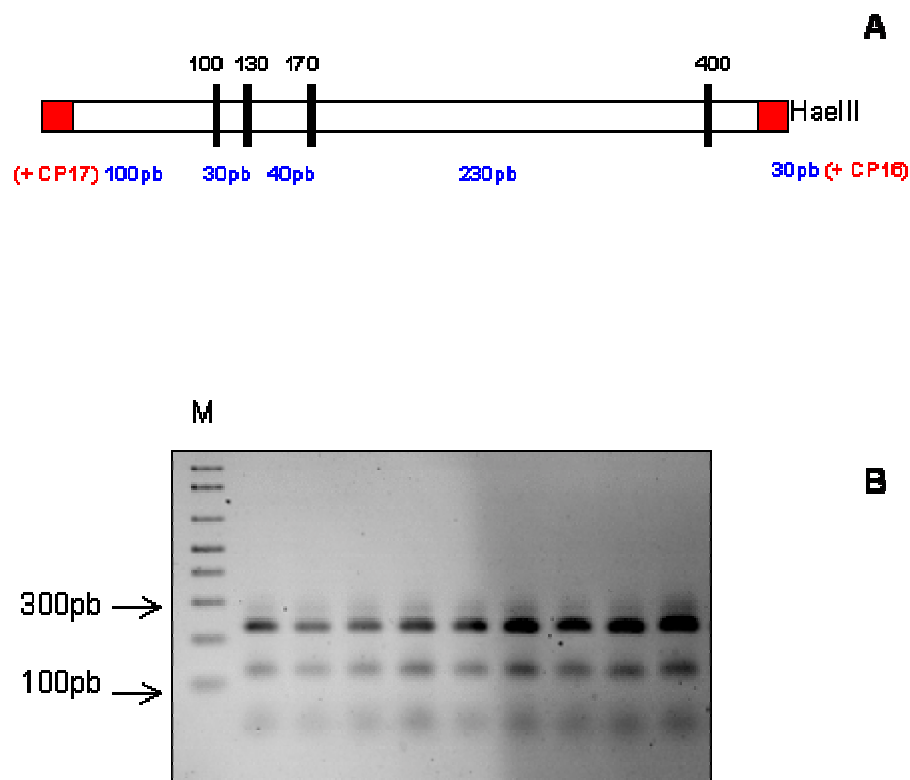


Figura 44. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease *HaeIII*. (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

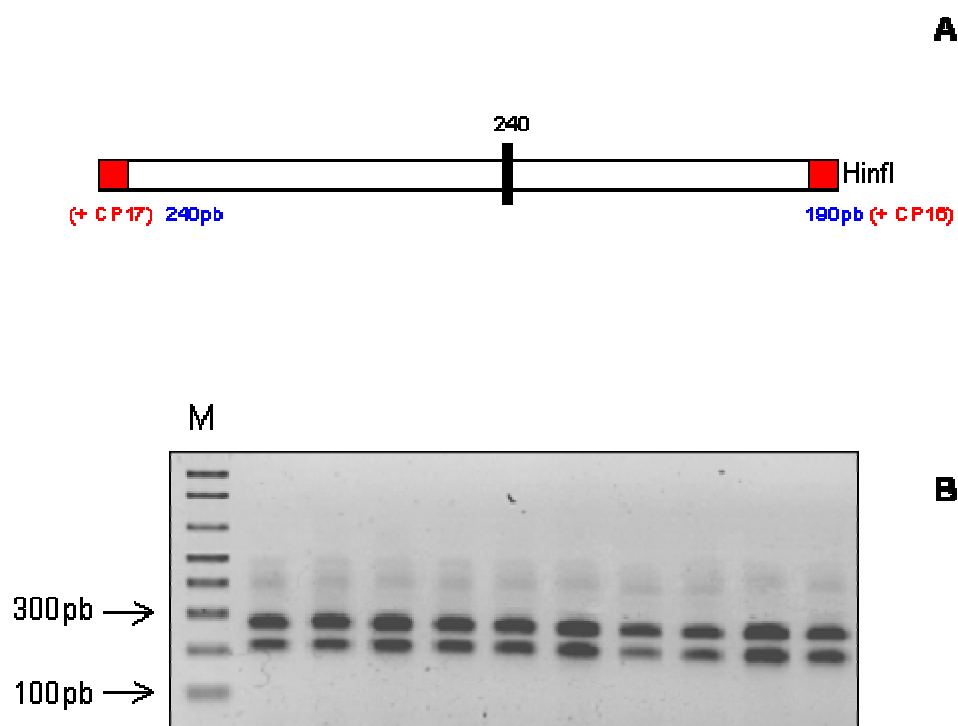


Figura 45. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease *HinfI*. (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

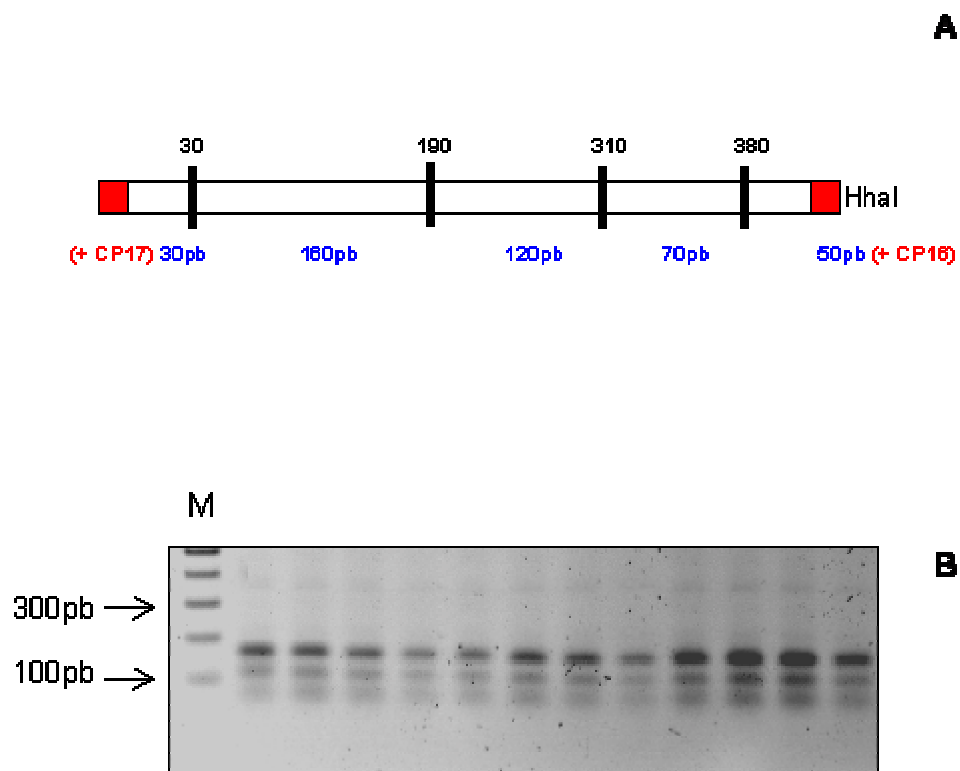


Figura 46. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease *HhaI*. (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

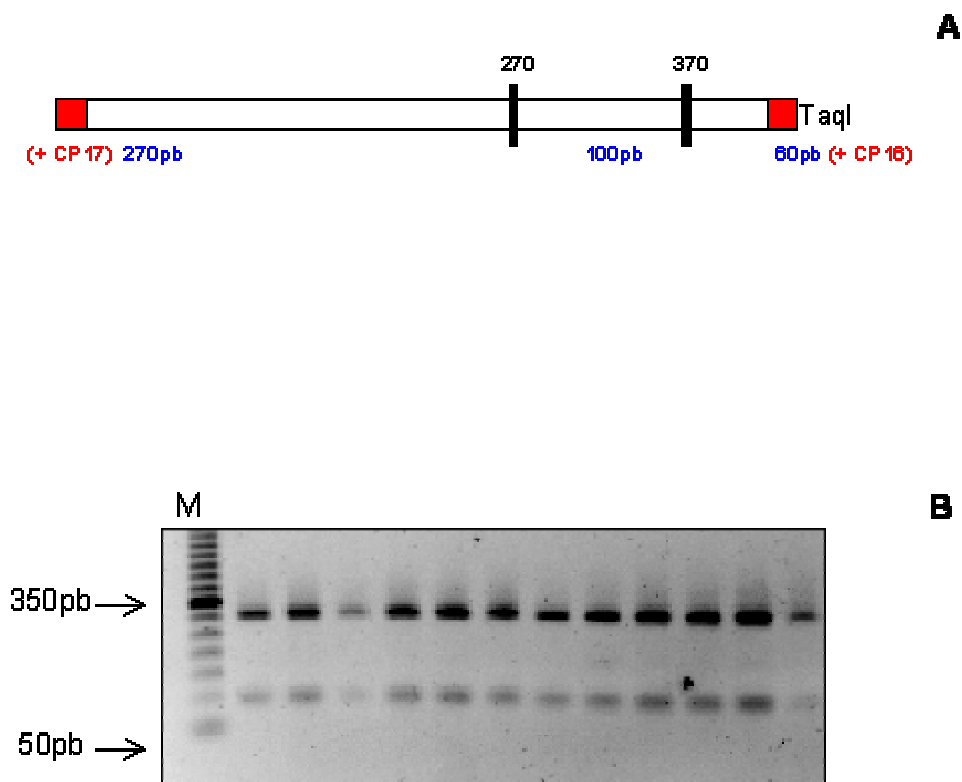


Figura 47. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease **TaqI**. (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).

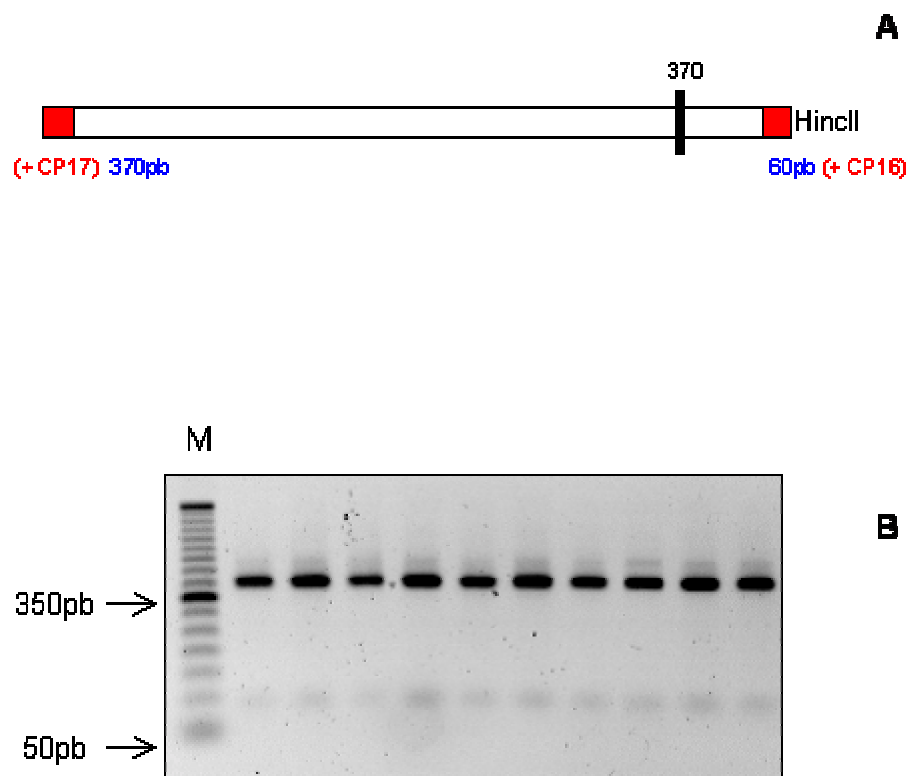


Figura 48. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease *HincII*. (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).

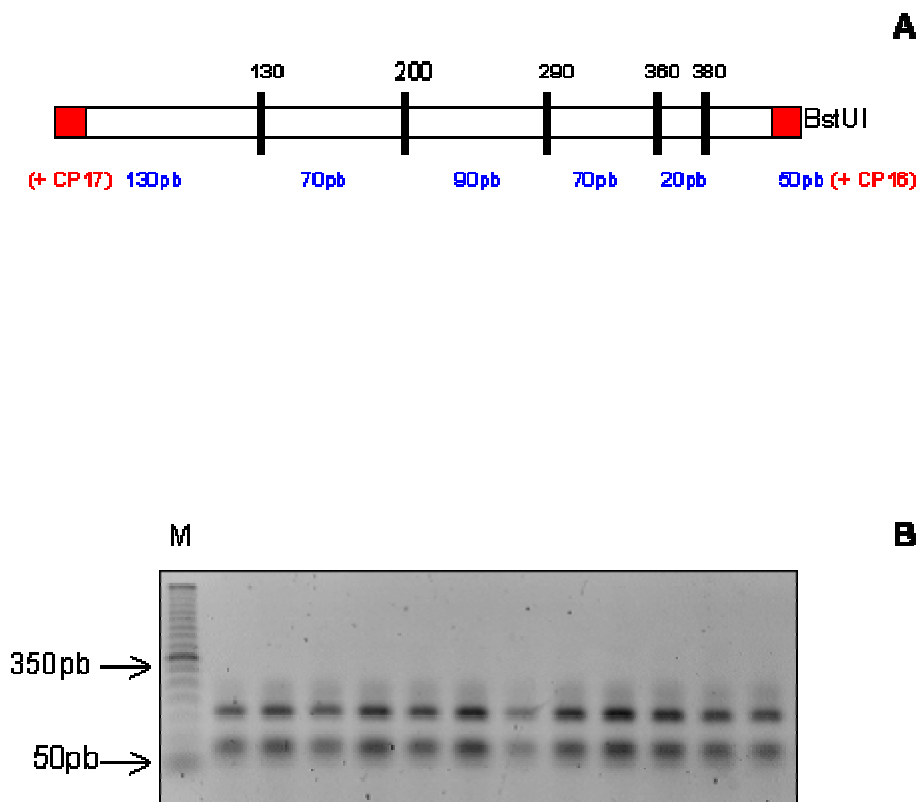


Figura 49. **A.** Diagrama esquemático representando os sítios de restrição (aproximados), na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii*, estimados a partir das seqüências disponíveis no GenBank (valores em preto). Comprimentos aproximados (pb) para os fragmentos após clivagem (valores em azul). **B.** Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com a endonuclease **BstUI**. (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).

4.2. 2 Comparação entre os perfis de restrição da região ITS2 e parte dos genes 28S e 5.8S de *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*

A amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles homunculus* resultou em fragmento que diferencia-se discretamente em comprimento daquele obtido para *Anopheles cruzii*, apresentando-se mais longo. Em *Anopheles bellator* esta região apresentou-se mais curta que nas demais espécies analisadas (Figura 50). A caracterização da região ITS2 de espécies de *Anopheles* (*Kerteszia*) também foi realizada por MALLAFRONTÉ *et al.* (2003). Estes autores destacam que a sequência da região ITS2 de *Anopheles cruzii* diferencia-se 1,5% de *Anopheles bellator* e 9,5% de *Anopheles homunculus*. Porém, os resultados obtidos por esses autores foram publicados na forma de resumo e as seqüências obtidas não foram depositadas no GenBank, o que dificulta a comparação entre os dados aqui obtidos.

Apesar de não terem sido observados polimorfismos entre os padrões de restrição de indivíduos de *Anopheles cruzii*, diferenças foram observadas entre as três espécies analisadas, *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*.

Com exceção de *Hinfl*, a maioria das enzimas testadas apresentaram sítios de restrição nas seqüências das três espécies. Na região ITS2 de *Anopheles bellator*, não há sítio de restrição para esta endonuclease, sendo observada apenas uma banda, cujo peso molecular corresponde ao fragmento intacto.

A restrição dos fragmentos amplificados com as enzimas *Sau96I*, *HhaI* e *HaeIII* produziu perfis de clivagem específicos, que permitiram a pronta identificação das três espécies (Figuras 51 a 56). Isto ocorreu, possivelmente, porque a região ITS2 é rica em GC e a utilização dessas enzimas apresenta maior probabilidade de detectar diferenças entre as espécies. Com as demais enzimas, a identificação simultânea não foi possível. A utilização da endonuclease *NruI* não permitiu a diferenciação entre *Anopheles cruzii* e *Anopheles*

bellator. Apenas a região ITS2 de *Anopheles homunculus* apresentou diferenças quanto ao padrão de restrição, sendo obtidos fragmentos de maior tamanho.

As endonucleases *Bst*UI, *Taq*I, *Hinf*I e *Hinc*II forneceram padrões de restrição muito semelhantes para *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*, sendo difícil a separação destas espécies, devido a baixa resolução obtida em gel de agarose 2%.

ROSA-FREITAS *et al.* (1998) destacam que *Anopheles homunculus* é morfológicamente próxima à *Anopheles cruzii*, podendo fazer parte de um complexo de espécies. Apesar da possibilidade de existirem diferenças intraespecíficas e múltiplas cópias da região ITS2 em um indivíduo, a técnica PCR-RFLP pode ser utilizada para o diagnóstico específico dessas espécies. Embora quatro enzimas testadas tenham produzido fragmentos muito semelhantes em *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*, mas a utilização das enzimas *Nru*I, *Hae*III, *Sau*96I e *Hha*I mostrou-se eficiente na identificação dessas espécies. Apesar da similaridade morfológica, essas espécies apresentam diferenças na região ITS2 que podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos moleculares.

A técnica PCR-RFLP aplicada a região ITS2 tem sido utilizada com sucesso para identificação de várias espécies de *Anopheles*. VAN BORTEL *et al.* (2002) verificaram que a clivagem da região ITS2 com *Bsi*ZI é capaz de identificar sete espécies da série *Myzomyia*, permitindo melhor definição entre espécies vetoras e não vetoras de *Plasmodium*. FANELLO *et al.* (2002), utilizando a enzima *Hha*I, identificaram cinco espécies do complexo *gambiae* e as formas Savana e Mopti de *Anopheles gambiae* s.s.. TORRES *et al.* (2000) diferenciaram *Anopheles dispar* Rattanaarithikul & Harbach de *Anopheles greeni* Rattanaarithikul & Harbach, através da restrição da região ITS2 com a endonuclease *Hae*II. GARROS *et al.* (2004) apontam que treze espécies de *Anopheles* (*Cellia*) podem ser diagnosticadas com a utilização da enzima *Bsi*ZI e VAN BORTEL *et al.* (2000), utilizando a mesma enzima, obtiveram padrões diagnósticos para duas espécies do complexo *minimus* e quatro espécies próximas que podem ocorrer em simpatria. GAO *et al.* (2004) utilizando as enzimas *Hinf*I e

RsaI obtiveram perfis diagnósticos para *Anopheles sinensis* (Wiedman) e *Anopheles anthropophagus*.

Em *Anopheles bellator*, diferenças foram observadas quanto aos padrões gerados após restrição do ITS2 com a enzimas *Sau96I*, cuja soma dos fragmentos gerados ultrapassa o peso molecular do fragmento intacto, o que sugere duas possibilidades: falha da reação de clivagem devido a presença de algum agente inibidor ou presença de mais de uma cópia da região ITS2. A primeira possibilidade foi descartada após realização de nova PCR seguida de restrição, as quais geraram os mesmos resultados. Além disso, o restante do produto de PCR foi clivado com outra enzima e gerou fragmentos cuja soma foi compatível com a observada para o fragmento não clivado. Porém, a confirmação da existência de heterogeneidade intragenômica em *Anopheles bellator*, deve ser confirmada através da clonagem e seqüenciamento de vários clones de um mesmo indivíduo.

Embora a maioria das espécies de *Anopheles* apresentem pouca ou nenhuma variabilidade intraespecífica e intraindividual (PORTER *et al.*, 1991; TORRES *et al.*, 2000; LINTON *et al.*, 2002; PHUC *et al.*, 2003), em algumas espécies é possível detectar polimorfismos intragenômicos na seqüência da região ITS2.

BEEBE *et al.* (2001) verificaram mais de uma forma da região ITS2 em indivíduos do grupo *Anopheles bancroftii* através de PCR-RFLP, seqüenciamento e HDA (*heteroduplex analysis*). GAO *et al.* (2004) verificaram variabilidade intragenômica em *Anopheles sinensis* e *Anopheles anthropophagus* através de eletroforese dos produtos de PCR-ITS2 em gel de acrilamida. ONYABE & CONN (1999), através de clonagem e seqüenciamento, também verificaram variação quanto ao número de cópias do espaçador ITS2 em indivíduos de *Anopheles nuneztovari*. Muitas das diferenças detectadas por esses autores referem-se a *indels* (inserções/deleções) em seqüências repetitivas, os quais determinam diferenças quanto ao tamanho das seqüências.

Em espécies de outros grupos, variações intragenômicas também têm sido observadas. Em *Pediculus humanus* Linnaeus (Phthiraptera: Pediculidae), LEO & BARKER

(2002) detectaram altos níveis de polimorfismos e verificaram que seqüências do espaçador ITS2 não são monofiléticas, nessa espécie. Estes autores apontam ainda que, estas diferenças ocorrem porque a taxa de mutação é maior que a taxa de homogeneização. ALVAREZ & HOY (2002) também detectaram variabilidade intraindividual no espaçador ITS2 de *Ageniaspis citricola* Logvinoskaya e *Ageniaspis fuscicolis* Dalman (Hymenoptera: Encyrtidae). Segundo esses autores, todos os clones obtidos de um mesmo indivíduo foram diferentes e nenhuma das variantes observadas foram comuns entre as amostras analisadas. Esses autores destacam ainda que, a baixa variabilidade intraindividual observada em alguns grupos de insetos deve-se ao baixo número de clones analisados, comparado ao grande número de cópias presentes no genoma.

Segundo ONYABE & CONN (1999), extensiva variabilidade intragenômica em espaçadores ribossômicos pode gerar confusão em alguns estudos ao nível populacional e filogenético. Sendo necessário primeiro, analisar o processo de homogeneização da família multigênica em diferentes níveis (individual, populacional e específico), antes desta ser utilizada em estudos filogenéticos e como caracteres diagnósticos.

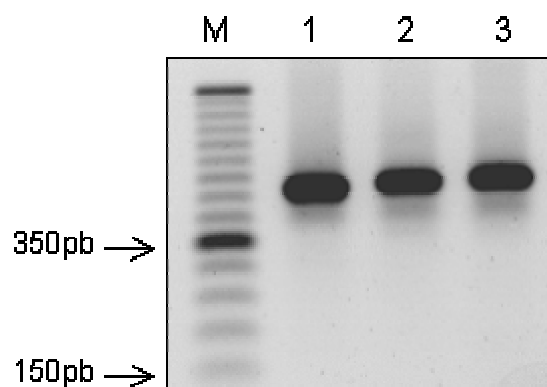


Figura 50. Produto de amplificação da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles bellator* (1), *Anopheles cruzii* (2) e *Anopheles homunculus* (3). (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).

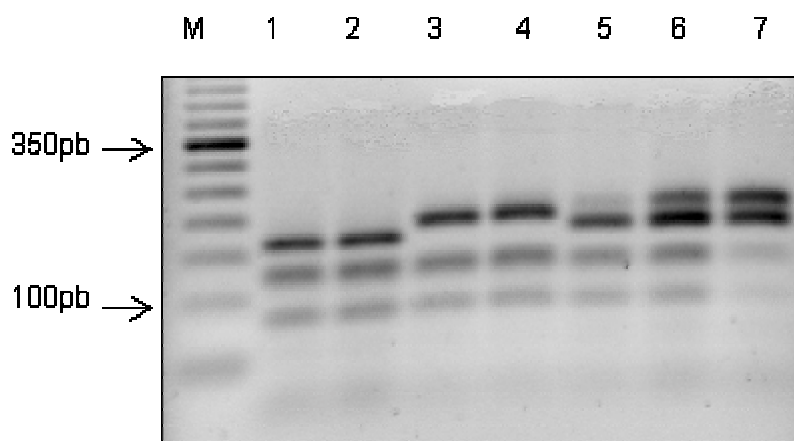


Figura 51. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles homunculus* (1-2), *Anopheles cruzii* (3-4) e *Anopheles bellator* (5-7) com *Sau96I*. (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).

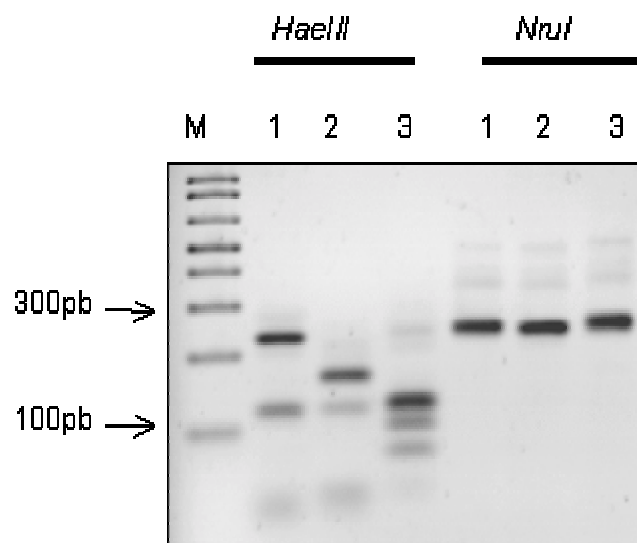


Figura 52. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S com *HaeIII* e *NruI*. *Anopheles cruzii* (1), *Anopheles bellator* (2) e *Anopheles homunculus* (3). (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

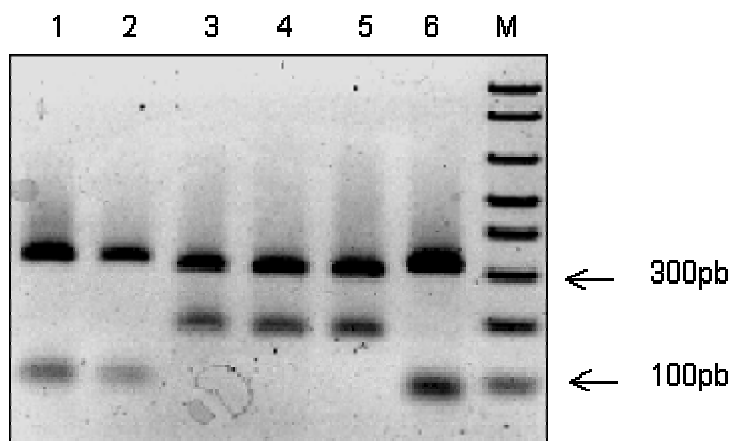


Figura 53. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S com *TaqI*. *Anopheles cruzii* (1-2), *Anopheles bellator* (3-5) e *Anopheles homunculus* (6). (M) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

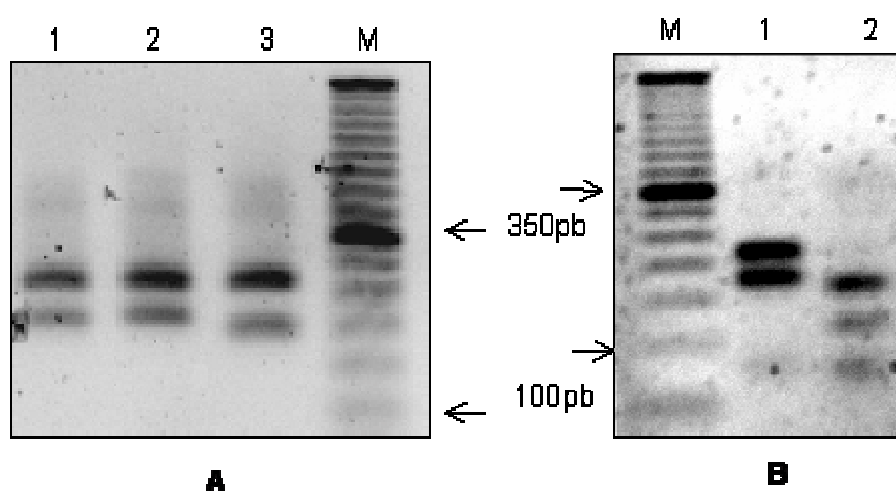


Figura 54. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S **(A)** com *Hinfl*. *Anopheles cruzii* (1), *Anopheles homunculus* (2), *Anopheles bellator* (3). **(B)** com *HhaI*. *Anopheles homunculus* (1) e *Anopheles cruzii* (2). (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).

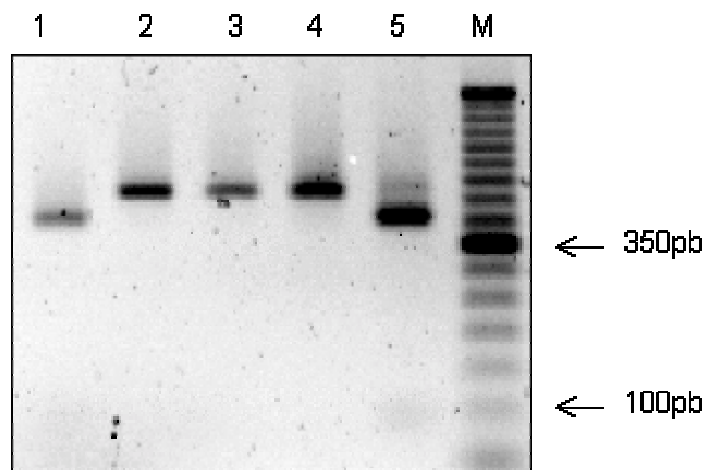


Figura 55. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S com *HincII*. *Anopheles cruzii* (1), *Anopheles bellator* (2- 4), *Anopheles homunculus* (5). (M) Marcador 50pb DNA Ladder (Invitrogen).

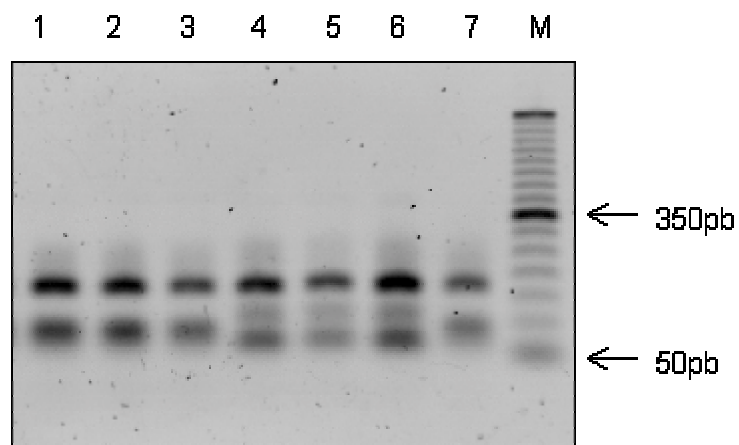


Figura 56. Padrão de restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* (1-3), *Anopheles bellator* (4-6) e *Anopheles homunculus* (7) com *BstUI*. (M) Marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen).

5. CONCLUSÕES

1. A partir dos perfis eletroforéticos obtidos através da técnica PCR-RAPD verificou-se que *Anopheles cruzii* é uma espécie com alto nível de polimorfismos, expressos na diversidade genética existente entre indivíduos irmãos, em indivíduos coletados numa mesma localidade ou em regiões diferentes.
2. Não foram detectados marcadores característicos aos indivíduos de *Anopheles cruzii* segundo a localidade de origem.
3. Exemplares identificados como *Anopheles cruzii* apresentam bandas exclusivas, que não foram compartilhadas por *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus*, e que podem constituir marcadores específico.
4. A restrição da região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S de *Anopheles cruzii* com as endonucleases *BstUI*, *HhaI*, *HaeIII*, *NruI*, *Sau96I*, *TaqI*, *HinfI* e *HincII* não revelou polimorfismos intraespecíficos. Entretanto, as amostras analisadas apresentam seqüências diferentes das disponíveis no GenBank, representando um terceiro tipo de ITS2.
5. Apesar de *Anopheles cruzii* ser considerada um complexo de espécies, não foram detectadas mais de uma espécie entre as amostras estudadas.
6. As técnicas PCR-RAPD e PCR-RFLP podem ser utilizadas para a identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*. A amplificação do DNA dessas espécies com os iniciadores OPY-10 e OPA-05, e a restrição da região ITS2 com as enzimas *NruI*, *HaeIII*, *Sau96I* e *HhaI*, mostraram-se eficientes na identificação de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora existam dúvidas sobre o *status* taxonômico de *Anopheles cruzii*, na região sul do Brasil apenas uma espécie tem sido detectada. Nessa região, modificações ambientais provocadas pela atividade antrópica têm provocado a diminuição das áreas de ocupação de *Anopheles cruzii*, fazendo com que em algumas localidades a captura desses insetos seja dificultada, o que reflete possivelmente a diminuição do tamanho das populações. Entretanto, ainda é possível observar que a espécie apresenta grande variabilidade genética, a qual possivelmente garante plasticidade para a ocupação e exploração de diferentes microhabitats.

Para populações presentes nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, não existem estudos sistematizados a respeito de aspectos ecológicos, morfológicos, biológicos e comportamentais dessa espécie. As informações disponíveis a esse respeito são incompletas, muitos dos trabalhos são resultantes do serviço de controle da malária durante as décadas de 1940-1970, que apresentavam como objetivo principal a eliminação do vetor e não o estudo mais aprofundado das espécies vetorais. A ausência de trabalhos mais abrangentes impede o resgate de informações que poderiam ser utilizadas para entender o comportamento da espécie ao longo do tempo. Além disso, correlações entre aspectos bioecológicos e dados citogenéticos e moleculares, já obtidos ou que venham a ser realizados, tornam-se um tanto comprometidas. A exemplo do que ocorre na região sul, não existem estudos abrangentes de populações presentes nos estados da região nordestina, onde, provavelmente, existe outra espécie do complexo *cruzii*.

Ainda não há consenso quanto ao número de espécies que constituem o complexo *cruzii* e nem quanto à distribuição dessas. As informações disponíveis até o momento são controversas, talvez como resultado da tentativa em se definir novas taxa com base em apenas um determinado tipo de caráter (enzimático, citogenético ou molecular, por

exemplo). Estudos futuros precisam levar em consideração que a detecção e descrição de espécies crípticas devem ser realizadas utilizando o maior número possível de técnicas e caracteres, tendo em vista que nem sempre as informações obtidas por um determinado marcador são corroboradas por outro.

A resolução do complexo *cruzii* poderá ser alcançada através:

1. do estudo do padrão de bandejamento de cromossomos politênicos de indivíduos de outras regiões ainda não estudadas e que abranjam a área de distribuição da espécie;
2. da correlação entre os citótipos estabelecidos e marcadores moleculares obtidos através do seqüenciamento de regiões ou genes (ITS, COI e COII, D3, *cyt-b*, microssatélites, por exemplo);
3. verificação do significado taxonômico de polimorfismos detectados na região ITS2, mediante clonagem e seqüenciamento de maior número de amostras de diferentes regiões;
4. verificação de possíveis caracteres morfológicos para os padrões estabelecidos através de estudos citogenéticos ou moleculares, com utilização de todos os estádios de desenvolvimento, inclusive ovos, os quais não são normalmente utilizados em estudos taxonômicos relacionados ao subgênero *Kerteszia*;
5. realização de estudos abrangendo aspectos bioecológicos, etológicos e a capacidade vetorial dos diferentes padrões estabelecidos.

Cabe ainda ressaltar, a importância do depósito de exemplares em museus. Todos os estudos taxonômicos utilizando dados bioquímicos, moleculares e citogenéticos, realizados até o momento, não mencionam a existência de materiais testemunhas (*voucher*), os quais poderiam facilitar a busca por possíveis marcadores morfológicos.

Estas são algumas das possibilidades a serem seguidas e que poderão esclarecer o *status* taxonômico das diferentes populações de *Anopheles cruzii*, bem como o possível papel de cada uma delas na epidemiologia da malária.

7. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, F. S.; L. M. K. SODRÉ & E. P. B. CONTEL. 2003. Population structure analysis of *Pimodolus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology** **26**(3): 301-305.
2. ALVAREZ, J. M. & M. A. HOY. 2002. Evaluation of the ribosomal ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Agéniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Annals of Entomological Society of America** **95**(2): 250-256.
3. AMARAL, J. 1942. Infecção natural de *Nyssorhynchus* (*Kerteszia*) *cruzi* e *bellator* (Diptera, Culicidae). **A Folha Médica** **28**(15): 1-9.
4. APOSTOL, B. L.; W. C. BLACK IV; P. REITER & B. R. MILLER. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. **Heredity** **76**: 325-334.
5. ARAGÃO, M. B. 1968a. O ciclo anual dos *Anopheles* do subgênero *Kerteszia*, no sul do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **66**(1):85-106.
6. ARAGÃO, M. B. 1968b. Sobre a distribuição vertical dos criadouros de *Anopheles* do subgênero *Kerteszia*, no sul do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **66**(2):131-144.
7. ARIAS, M. C. & M. E. INFANTE-MALACHIAS. 2001. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, pp. 143-152.
8. AYALA, F. J. 1975. Genetic differentiation during the speciation process. **Evolutionary Biology**. **8**: 1-78.
9. BALLINGER-CRABTREE, M. E.; W. C. BLACK IV & B. R. MILLER. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti*

- subspecies and populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **47**(6): 893-901.
10. BARUFFI, L.; G. DAMIANI; C. R. GUGLIELMINO; C. BANDIS; A. R. MALACRIDA & G. GASPERI. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. **Heredity** **74**: 425-437.
 11. BEEBE, N. W. & R. D. COOPER. 2000. Systematics of malaria vector with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. **International Journal for Parasitology** **30**: 1-17.
 12. BEEBE, N. W.; J. MAUNG; A. F. VAN DEN HURK; J. T. ELLIS & R. D. COOPER. 2001. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and Papua New Guinea. **Insect Molecular Biology** **10**(5): 407-413.
 13. BEEBE, N. W.; A. VAN DER HURK; H. F. CHAPMAN; S. P. FRANCES; C. R. WILLIAMS & R. D. COOPER. 2002. Development and evaluation of a species diagnostic polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism procedure for cryptic members of the *Culex sitiens* (Diptera: Culicidae) subgroup in Australia and the Southwest Pacific. **Journal Medical Entomology** **39**(2): 362-369.
 14. BENECKE, M. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. **Forensic Science International** **98**: 157-168.
 15. BLACK, W. C. IV. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Molecular Biology** **2**(1): 1-6.
 16. BLACK, W. C. IV; N. M. DUTEAU; G. J. PUTERKA; J. R. NECHOLS & J. M. PETTORINI. 1992. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** **82**: 151-159.

17. BOWDITCH, B. M.; D. G. ALBRIGHT; J. G. K. WILLIAMS & M. J. BRAUN. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA markers in comparative genomes studies. **Methods in Enzymology** **224**: 294-309.

18. BRANQUINHO, M. S.; M. T. MARRELLI; I. CURADO; D. NATAL; J. M. S. BARATA; R. TUBAKI; G. C. CARRÉRI-BRUNO; R. T. MENEZES & J. K. KLOETZEL. 1997. Infecção do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium vivax* variante VK247 nos municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo. **Revista Panamericana de Salud Publica** **2**(3): 189-193.

19. BRENIÈRE, S. F.; B. TAVEIRA; M. F. BOSSENO; R. ORDOÑEZ; F. LOZANO-KASTEN; E. MAGALLÓN-GASTÉLUM, A. OUAISSI & J. RAMSEY. 2003. Preliminary results of random amplification of polymerase DNA among *Triatoma* of *phyllosoma* complex (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**(8): 1033-1038.

20. BROWER, V. Z. & R. DESALLE. 1994. Practical and theoretical considerations for choice of a DNA sequence region in insect molecular systematics, with short review of published studies using nuclear gene regions. **Annals of Entomological Society of America** **87**(6): 702-716.

21. CARTER, M. C. A.; J. L. ROBERTSON; R. A. HAACK; R. K. LAWRENCE & J. L. HAYES. 1996. Genetic relatedness of North American populations of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae).

22. CARVALHO, A. O. & L. G. E. VIEIRA. 2001. Determinação das condições ótimas para análise de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology** **30**(4): 593-600.

23. CARVALHO, M. E. ; C. M. GLASSER; R. M. C. CIARAVOLO; A. ETZEL; L. A. SANTOS & C. S. FERREIRA. 1998. Sorologia da malária vivax no foco Aldeia dos Índios, município de Peruíbe, São Paulo, de 1984 a 1986. **Cadernos de Saúde Pública** **4**: 276-292.

24. CARVALHO-PINTO, C. J. & R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. 2003. Izoenzimatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**(8): 1045-1048.

25. CARVALHO-PINTO, C. J. & R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. 2004. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**(5): 471-475.
26. CHEUNG, W. Y.; N. HUBERT & B. S. LANDRY. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications** **3**: 69-70.
27. COETZEE, M.; R. H. HUNT; L. E. O. BRAACK. 1993. Enzyme variation at the aspartate aminotransferase locus in members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology** **30**: 303-308.
28. COLLINS, F. H.; MENDEZ, M. A.; M. O. RASMUSSEN; P. C. MAHAFFEY; N. J. BESANSKY & V. FINNERTY. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates members species of the *Anopheles gambiae* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **37**: 37-41.
29. COLLINS, F. H.; S. M. PASKEWITZ & V. FINNERTY. 1989. Ribosomal RNA genes of the *Anopheles gambiae* complex. **Advances in Disease Vector Research** **6**: 1-28.
30. COLLINS, F. H. & S. M. PASKEWITZ. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. **Insect Molecular Biology** **5**(1): 1-9.
31. COLLINS, F. H.; H. A. RANSON & J. M. VULULE. 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. **Bulletin of the World Health Organization** **78**(12): 1412-1413.
32. COLUZZI, M. 1970. Sibling species in *Anopheles* and their importance in malariology. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America** **7**: 63-72.
33. COLUZZI, M.; V. PETRARCA & M. A. DI DECO. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human enviroments in the *Anopheles gambiae* complex. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **73**(5): 483-497.

34. CONN, J. E.; M. G. ROSA-FREITAS; S. L. B. LUZ & H. MOMEN. 1999. Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. **Journal of the American Control Association** **15**(4): 468-474.
35. CONSOLIM, J.; E. LUZ; A. M. VIEIRA & A. M. BORBA. 1979. Alguns aspectos epidemiológicos sobre a persistência de transmissão de malária no litoral paranaense. III. Entrada e permanência de *Anopheles cruzii* na habitação humana (Diptera, Culicidae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia** **22**(2): 173-179.
36. CORNEL, A. J.; C. H. PORTER & F. H. COLLINS. 1996. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. **Journal of Medical Entomology** **33**(1): 109-116.
37. COUTINHO, J. O.; R. RACHOU & I. RICCIARDI. 1943. Contribuição para o conhecimento dos transmissores de malária no Brasil – *A. (K.) cruzi* e *A. (K.) bellator*. **Arquivos de Higiene** **13**(2): 115-127.
38. DEANE, L. M. 1986. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **81**(Suppl.2): 5-14.
39. DEANE, L. M. 1992. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **87**(Suppl.3): 1-20.
40. DEANE, L. M.; J. A. FERREIRA-NETO & L. M. MOURA. 1984. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in Southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **79**: 461-463.
41. DUSFOUR, I.; Y. M. LINTON; A. COUHET; R. E. HARBACH, V. BAIMAI; H. D. TRUNG; C. M. SENG; A. MATUSOP & S. MANGUIN. 2004. Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), a principal malaria vector taxon in Southeast Asia. **Journal of Medical Entomology** **41**(3): 287-295.

42. DYAR, G.H. & F. KNAB. 1908. Description of some new mosquitoes from tropical America. **Proceedings of the United States National Museum** **35**: 53-70.
43. EDWARDS, O. R. & M. A. ROY. 1993. Polymerase in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Biological Control** **3**: 243-257.
44. EXCOFFIER, L.; P. E. SMOUSE & J. M. QATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetic** **131**: 479-491.
45. FANELLO, C.; F. SANTOLAMAZZA & A. DELLA TORRE. 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. **Medical and Veterinary Entomology** **16**: 461-464.
46. FAVIA, G.; G. DIMOPOULOS & C. LOUIS. 1994a. Analysis of the *Anopheles gambiae* genome with RAPD markers. **Insect Molecular Biology** **3**(3): 149-157.
47. FAVIA, G.; G. DIMOPOULOS; A. DELLA TORRE; Y. T. TOURÉ; M. COLUZZI & C. LOUIS. 1994b. Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **91**: 10315-10319.
48. FAVIA, G.; A. LANFRANCOTTI; L. SPANOS; I. SIDÉN-KIAMOS & C. LOUIS. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Molecular Biology** **10**(1): 19-23.
49. FERREIRA, M. E. & D. GRATTAPAGLIA. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
50. FONSECA, D. M.; S. CAMPBELL; W. J. CRANS; M. MOGI; I. MIYAGI; T. TOMA; M. BULLIANS; T. G. ANDREADIS; R. L. BERRY; B. PAGAC; M. R. SARDELIS & R. C. WILKERSON. 2001. *Aedes (Finlaya) japonicus* (Diptera: Culicidae), a newly recognized mosquito in the United States: analyses of genetic variation in the United

- States and putative source populations. **Journal of Medical Entomology** **38**(2):135-146.
51. FORATTINI, O. P. 1962. **Entomologia Médica**. Vol. 1., Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, 662p.
52. FORATTINI, O. P. 2002. **Culicidologia Médica**. Volume 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
53. FORATTINI, O. P.; R. R. CORRÊA; E. X. RABELLO & O. GUARITA. 1961. Algumas observações sobre a densidade de anofelíneos *Kerteszia* no Estado de São Paulo, Brasil. **Aquivos de Hygiene e Saúde Pública** **26**: 249-256.
54. FORATTINI, O. P.; A. C. GOMES; D. NATAL & J. L. F. SANTOS. 1986a. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae em mata primitiva da encosta no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **20**(1): 1-20.
55. FORATTINI, O. P.; A. C. GOMES; D. NATAL & J. L. F. SANTOS. 1986b. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae em mata primitiva da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **20**(3): 178-203.
56. FORATTINI, O. P.; I. KAKITANI; R. L. C. SANTOS; K. M. KOBAYASHI; H. M. UENO & Z. FERNÁNDEZ. 2000. Potencial sinantrópico de mosquitos *Kerteszia* e *Culex* (Diptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública** **34**(6): 565-569.
57. FREITAS-SIBAJEV, M. G. R.; J. CONN; S. E. MITCHELL; A. F. COCKBURN; J. A. SEAWRIGHT & H. MOMEN. 1995. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics** **27**(2): 78-99.
58. FRITZ, G. N.; S. K. NARANG; D. L. KLINE; J. A. SEAWRIGHT; R. K. WASHINO; C. H. PORTER & F. H. COLLINS. 1991. Diagnostic characterization of *Anopheles freeborni* and *An. hermsi* by hybrid crosses, frequencies of polytene X chromosomes and rDNA

- restriction enzyme fragments. **Journal American Mosquito Control Association** 7: 198-206.
59. FRITZ, G. N.; H. BERMUDEZ & J. A. SEAWRIGHT. 1995. Genetic differentiation and diagnostic loci of *Anopheles nuneztovari*, *An. trikae* and *An. rangeli* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology** 32(5): 663-672.
 60. GAO, Q.; N. W. BEEBE & R. D. COOPER. 2004. Molecular identification of the malaria vector *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in Central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the Hyrcanus group. **Journal of Medical Entomology** 41(1): 5-11.
 61. GARROS, C.; L. L. KOEKEMOER; L. KAMAU; T. S. AWOLOLA; W. VAN BORTEL; M. COETZEE; M. COOSEMANS & S. MANGUIN. 2004. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors with the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 70(3): 260-265.
 62. GREEN, C. A.; R. F. GASS; L. E. MUNSTERMANN & V. BAIMAI. 1990. Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. **Medical Veterinary Entomology** 4: 25-34.
 63. GUIMARÃES, A. E.; C. GENTILE; C. M. LOPES & R. P. MELLO. 2000. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II-Habitat distribution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 95(1): 17-28.
 64. HACKETT, B. J.; J. GIMNIG; W. GUELBEOGO; C. CONSTANTINI; L. L. KOEKEMOER; M. COETZEE; F. H. COLLINS & N. L. BESANSKY. 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. **Insect Molecular Biology** 9(4): 369-374.
 65. HADRYIS, H. ; M. BALLICK & B. SCHIERWATER. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology** 1: 55-63.

66. HAYMER. D. S. & D. O. McINNIS. 1994. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. **Genome** **37**: 244-248.
67. HEYMAN, M. 1997. **Webcutter version 2.0**. Disponível em: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>. Último acesso em : março de 2005.
68. HOLT, R. A.; G. M. SUBRAMANIAN; A. HALPERN; G. G. SUTTON; R. CHARLAB; D. R. NUSSEKERN. P. WINCKER; A. G. CLARK; J. M. C. RIBEIRO; R. WIDES; S. L. SALZBERG; B. LOFTUS; M. YANDELL; W. H. MAJOROS; D. B. RUSCH; Z. LAI; C. L. KRAFT; J. F. ABRIL; V. ANTHOUARD; P. ARENSBURGER; P. W. ATKINSON; H. BANDEN; V. BERARDINIS; D. BALDWIN; V. BENES; J. BIEDLER; C. BLASS; R. BOLANOS; D. BOSCUS; M. BARNSTEAD; S. CAI; A. CENTER; K. CHATUVERDI; G. K. CHRISTOPHIDES; M. A. CHRYSTAL; M. CAMP; A. CRAVCHIK; V. CURWEN; A. DANA; A. DELCHER; I. DEW; C. A. EVANS; M. FLANIGAN; A. GRUNSCHOBBER-FREIMOSER; L. FRIEDLI; Z. GU; P. GUAN; R. GUIGO; M. E. HILLENMEYER; S. L. HLADUN; J. R. HOGAN; Y. S. HONG; J. HOOVER; O. JAILLON; Z. KE; C. KODIRA; E. KOKOZA; A. KOUTSOS; I. LETUNIC; A. LEVITSKY; Y. LIANG; J.-J. LIN; N. F. LOBO. J. R. LOPEZ; J. A. MALEK; T. C. McINTOSH; S. MEISTER; J. MILLER; C. MOBARRY; E. MONHUIN; S. D. MURPHY; D. A. O'BROCHA; C. PFANNKOCH; R. QI; M. A. REGIER; K. REMINGTON; H. SHAO; M. V. SHARAKHOVA; C. D. SITTER; J. SHETTY; T. J. SMITH; R. STRONG; J. SUN; D. THOMASOVA; L. Q. TON; P. TOPALIS; Z. TU; M. F. UNGER; B. WALENZ; A. WANG; J. WANG; M. WANG; X. WANG; K. J. WOODFORD; J. R. WORTMAN; M. WU; A. YAO; E. M. ZDONOV; H. ZHANG; Q. ZHAO; S. ZHAO; S. C. ZHU; I. ZHIMULEZ; M. COLUZZI; A. DELLA TORRE; C. W. ROTH; C. LOUIS; F. KALUSH; R. J. MURAL; E. W. MYERS; M. D. ADAMS; H. O. SMITH; S. BRODER; M. J. GARDNER; C. M. FRASER; E. BIRNEY; P. BORK; P. T. BREY; J. C. VENTER; J. WEISSENBAACH; F. C. KAFATOS; F. H. COLLINS & S. L. HOFFMAN. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science** **298**:129-149.
69. HWANG, U. W. & W. KIM. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. **The Korean Journal of Parasitology** **37**(4): 215-228.

70. HYMAN, N.; F. UTTER & L. LAIKRE. 1995. Protection of intraespecific biodiversity of exploited fishes. **Review Fish Biol Fish** **5**: 471-446.
71. JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distributin florale. **Bull. Soc. Vaudoise Sc. Nat.** **44**: 223-270.
72. KAMBHAMPATI, S.; W. C. BLACK IV & K. S. RAI. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical analysis and applications. **Journal of Medical Entomology** **29**(6): 939-945.
73. KENGNE, P.; P. AWONO-AMBENE; C. ANTONIO-NHONDJIO; F. SIMARD & D. FONTENILLE. 2003. Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors. **Medical and Veterinary Entomology** **17**: 67-74.
74. KLOWDEN, M. J. 2001. Sexual receptivity in *Anopheles gambiae* mosquitoes: absence of control by male acessory gland substances. **Journal of Insect Physiology** **47**: 661-666.
75. KOEKEMOER, L. L.; L. LOCHOUARN; R. H. HUNT & M. COETZEE. 1999. Single-strand conformation polimorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidade) group. **Journal of Medical Entomology** **36**(2): 125-130.
76. KOEKEMOER, L. L.; L. KAMAU; R. H. HUNT & M. COETZEE. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. **American Journal of Medicine and Hygiene** **6**(6): 804-811.
77. KOMP, W. H. W. 1937. The species of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera, Culicidae). **Annals of Entomological Society of America** **30**: 493-527.
78. KREUTZER, R. D.; J. D. KITZMILLER & M. G. RABBANI. 1976. Cytogenetically distinguishable sympatric and allopatric populations of the mosquito *Anopheles albitarsis*. **Acta Amazônica** **6**: 473-481.

79. KRYZWINSKI, J.; R. C. WILKERSON & N. J. BESANSKY. 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **18**(3): 479-487.
80. LAMBERT, D. M. 1983. A population genetical study of the african mosquito *Anopheles marshallii* (Theobald). **Evolution** **37**: 484-495.
81. LEO, N. P. & S. C. BARKER. 2002. Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the louse of humans, *Pediculus humanus*: ITS2 is not a suitable marker for population studies in this species. **Insect Molecular Biology** **11**(6): 651-657.
82. LIAO, D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. **American Journal of Human Genetic** **64**: 24-30.
83. LIMA, M. M. 1952. Do diagnóstico diferencial entre o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e o *Anopheles (Kerteszia) homunculus* na fase larvária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** **4**: 401-411.
84. LINTON, Y. N.; A. SAMANIDOU-VOYADJOGLU & R. E. HARBACH. 2002. Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece, with a critical assesment of previously published sequences. **Insect Molecular Biology** **11**(4): 379-383.
85. LOUNIBOS, L. P.; R. WILKERSON; J. E. CONN; J. L. HRIBAR; G. N. FRITZ & J. A. DANOFF-BURG. 1998. Morphological, molecular, and chromosomal discrimination of cryptic *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) from South America. **Journal of Medical Entomology** **35**(5): 830-838.
86. LUZ, E.; J. CONSOLIM; A. M. VIEIRA & A. M. BORBA. 1977. Sobre a longevidade de *Anopheles cruzii* em laboratório (Diptera, Culicidae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia** **20**: 31-33.
87. LUZ, E.; J. CONSOLIM; O. C. BARBOSA & P. B. TORRES. 1987. Larvas de *Anopheles* (Subgênero *Kerteszia*) Theobald, 1905 encontradas em criadouros artificiais, no Estado do Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **21**(5): 466-468.

88. MALLAFRONT, R. S.; M. T. MARRELLI; G. C. CARRERI-BRUNO; P. R. URBINATTI & O. MARINOTTI. 1997. Polymorphism in the second internal spacer (ITS2) of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) from the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **92**(Supl. I): 306.
89. MALLAFRONT, R. S.; O. MARINOTTI; M. T. MARRELLI; R. TUBAKI; I. CURADO & M. N. NASSAR. 2003. Phylogeny and polymorphism of the *Kerteszia* subgenus assessed by second internal transcribed spacer (ITS2) of rDNA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **45**(Supl. 13): 208-209.
90. MANGUIN, S.; R. C. WILKERSON; J. E. CONN; Y. RUBIO-PALIS; J. A. DANOF-BURG & D. R. ROBERTS. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **60**(3): 364-376.
91. MARTINS, C. M. 1958. Do diagnóstico diferencial específico entre o *Anopheles (Kerteszia) cruzii cruzii* e o *Anopheles (Kerteszia) homunculus* pelos caracteres dos adultos fêmeas (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** **10**: 429-430.
92. MARRELLI, M. T.; R. MALAFRONT; C. FLORES-MENDOZA; R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; J. K. KLOETZEL & O. MARINOTTI. 1999. Sequence analysis of the second transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology** **36**(6): 679-684.
93. MERIDA, A. M. P.; M. P. MATA; E. MOLINA; C. H. PORTER & W. C. BLACK IV. 1995. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **53**(5): 469-477.
94. MILLER, M. P. 1997. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3**. Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Departamento of Biological Sciences, Northern Arizona University, AZ. Disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net>. Último acesso em: março de 2005.

95. MILLER, M. P. 1998. **AMOVA-PREP versão 1.01**. A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-marker row data. Departamento of Biological Sciences, Northern Arizona University, AZ. Disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net>. Último acesso em: março de 2005.
96. MNZAVA, A. E. P.; R. T. RWEGOSHORA; T. J. WILKES, M. TANNER & C. F. CURTIS. 1995. *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* chromosomal inversion polymorphism, feeding and resting behaviour in relation to insecticide house-spraying in Tanzania. **Medical and Veterinary Entomology** 9: 316-324.
97. MOYA, A.; P. GUIRAO; D. CIFUENTES; F. BEITIAS & J. L. CENIS. 2001. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Molecular Ecology** 10: 891-897.
98. MUKABAYIRE, D. B.; L. LOCHOUARN; D. FONTENILLE & N. J. BESANSKI. 1999. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. **Molecular Ecology** 8(2): 289-297.
99. MULLIS, K. B. & F. A. FALOONA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology** 155: 335-350.
100. NAHUM, L. A. 2001. Evolução de genomas. In MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, pp. 82-96.
101. NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. **American Naturalist** 106: 283-292.
102. NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590.
103. ONYABE, D. Y. & J. E. CONN. 1999. Intragenomic heterogeneity of ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology** 8(4): 435-442.

104. OTRANTO, D. & J. R. STEVENS. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis larvae. **International Journal for Parasitology** **32**: 1345-1360.
105. PASKEWITZ, S. M.; D. M. WESSON & F. H. COLLINS. 1993. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Molecular Biology** **2**(4): 247-257.
106. PATERSON, H. E. 1980. A comment on "Mate Recongnition Systems". **Evolution** **34**:330-331.
107. PEYTON, E. L. 1989. A new classification for the *Leucophyrus* group of the *Anopheles* (*Cellia*). **Mosquito Systematic** **21**: 197-205.
108. PEYTON, E. L. & S. RAMALIGAN. 1988. *Anopheles* (*Cellia*) *nemophilus*, a new species of the *Leucophyrus* group from peninsular Malaysia and Thailand (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematic** **20**: 272-299.
109. PORTER, C. H. & F. H. COLLINS. 1991. Species-diagnostic difference in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **45**(2): 271-279.
110. POSSO, C. E.; R. GONZÁLEZ; H. CÁRDENAS; G. GALLEGU; M. C. DUQUE & M. F. SUAREZ. 2003. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Western and Northeastern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**(4): 469-476.
111. PHUC, H. K.; A. J. BALL; N. V. HANK; N. T. TU; N. G. LIEN; A. VERARDI & H. TOWNSON. 2003. Multiplex PCR assay for malaria vector *Anopheles minimus* and four related species in the *Myzomyia* series from Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology** **17**:423-428.
112. RACHOU, R. G. 1950. Observações sôbre o ciclo evolutivo dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* em laboratório: fase de ovo. **Revista Brasileira de Malariologia** **2**(2): 111-118.

113. RACHOU, R. G. 1952. Sobre o combate aos anofelinos do subgênero *Kerteszia* no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 4(3): 245-254.
114. RACHOU, R. G. & M. O. FERREIRA. 1966a. Do encontro accidental de larvas de *Kerteszia* em coleções aquáticas terrestres e do encontro esporádico de anofelinos outros que não *Kerteszia* em bromeliaceas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 18(3): 687-689.
115. RACHOU, R. G. & M. O. FERREIRA. 1966b. As Kerteszas como grandes responsáveis pela malária no litoral do estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 18(3): 691-697.
116. RACHOU, R. G.; I. RICCIARDI & E. LUZ. 1949. Dispersão ativa e passiva dos anofelinos do sub-gênero *Kerteszia* no litoral paranaense. **Revista Brasileira de Malariologia** 1(3): 211-219.
117. RAICH, T. J.; J. L. ARCHER; M. A. ROBERTSON; W. J. TABACHNIK & B. J. BEATY. 1993. Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. **Journal of Medical Entomology** 30(1): 228-232.
118. RAMIREZ, C. C. L. & E. M. B. DESSEN. 1994. Cytogenetic analysis of a natural population of *Anopheles cruzii*. **Revista Brasileira de Genética** 17(1): 41-46.
119. RAMIREZ, C. C. L.; E. M. B. DESSEN & P. A. OTTO. 1994. Inversion polymorphism in natural population of *Anopheles cruzii*. **Caryologia** 47(2): 121-130.
120. RAMIREZ, C. C. L. & E. M. B. DESSEN. 1996. The polytene chromosomes of the mosquito *Anopheles bellator* compared with those of *Anopheles cruzii*. **Brazilian Journal of Genetics** 19(4): 555-558.
121. RAMIREZ, C. C. L. & E. M. B. DESSEN. 2000a. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*. **Genome** 43: 143-151.
122. RAMIREZ, C. C. L. & E. M. B. DESSEN. 2000b. Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*: evidence for a third sibling species. **Genetica** 108: 73-80.

123. RENO, H. E.; M. H. VODKIN & R. J. NOVAK. 2000. Differentiation of *Aedes triseriatus* (Say) from *Aedes hendersoni* Cockerell (Diptera: Culicidae) by restriction fragment length polymorphisms of amplified ribosomal DNA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **62**(2): 193-199.
124. ROHLF, F. J. 1992. **NTSYS-PC**. Numerical taxonomy and multivariate analysis systems. Exeter Software, Applied Biostatistics, N. Y. 225pp.
125. ROMI, R.; D. BOCCOLINI; M. DI LUCA; G. LA ROSA & M. MARINUCCI. 2000. Identification of the sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex by heteroduplex analysis. **Insect Molecular Biology** **9**(5): 509-513.
126. ROSA-FREITAS, M. G.; L. M. DEANE & H. MOMEN. 1990. A morphological, isoenzymatic and behavioural study of ten populations of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (Diptera: Culicidae) including from the type-locality – Baradero, Argentina. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz** **85**: 2875-2879.
127. ROSA-FREITAS, M. G.; R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; C. J. CARVALHO-PINTO; C. FLORES-MENDOZA & T. F. SILVA-DO-NASCIMENTO. 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **93**(5): 651-655.
128. RUTLEDGE, C. R.; D. M. WESSON & C. L. MEEK. 1999. Polymerase chain reaction to identify all immature stages of two species of the *Anopheles quadrimaculatus* sibling species complex (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association** **15**(4): 573-575.
129. SAIKI, R. K.; D. H. GELFAND; S. STOFFEL; S. J. SCHARF; R. HIGUCHI; G. L. HORN; K. B. MULLIS & H. A. ERLICH. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **239**: 487-491.
130. SALLUM, M. A. M.; T. R. SCHULTZ & R. C. WILKERSON. 2000. Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters. **Annals of Entomological Society of America** **93**(4): 745-775.

131. SALLUM, M. A. M.; T. R. SCHULTZ; P. G. FOSTER; K. ARONSTEIN; R. A. WIRTZ & R. C. WILKERSON. 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Systematic Entomology** **27**: 361-382.
132. SARALA, K. S.; N. NUTAN; K. VASANTHA; V. K. DUA; M. S. MALHOTRA; R. S. YADAV & V. P. SHARMA. 1994. Cytogenetic evidence for three sibling species in *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Annals of Entomological Society of America** **87**(1): 116-121.
133. SCARPASSA, V. M.; S. GEURGAS; A. M. L. AZEVEDO-ESPIN & W. P. TADEI. 2000. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. **Genetics and Molecular Biology** **23**(1): 71-78.
134. SCHAFFNER, F.; M. RAYMOND & N. PASTEUR. 2000. Genetic differentiation of *Anopheles claviger* s.s. in France and neighbouring countries. **Medical and Veterinary Entomology** **14**: 264-271.
135. SCOTT, J. A.; W. G. BROGDON & F. H. COLLINS. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **49**(4): 520-529.
136. SEBASTIANI, F.; R. MEISWINKEL; L. M. GOMULSKI; C. R. GUGLIELMONO; P. S. MELLOR; A. R. MALACRIDA & G. GASPERI. 2001. Molecular identification of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Diptera, Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. **Molecular Ecology** **10**: 1773-1786.
137. SHARPE, R. G.; R. E. HARBACH & R. K. BUTLIN. 2000. Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus Group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). **Systematic Entomology** **25**: 263-272.
138. SIMARD, F.; D. FONTENILLE; R. GIROD; L. BRUTUS; R. GOPAUL; C. DOURNON & F. H. COLLINS. 1999. High amounts of genetic differentiation between populations of

- the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and Eastern Outer Islands. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **60**(6): 1000-1009.
139. SKODA, S. R.; S. PORNKULWAT & J. E. FOSTER. 2002. Random amplified polymorphic DNA markers for discriminanting *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Bulletin of Entomological Research** **92**: 89-86.
 140. SOUZA, C. M.; C. L. FORTES-DIAS; P. M. LINARDI & E. S. DIAS. 2004. Phenetic studies on randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction-variability of four geographical populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **37**(2): 148-153.
 141. TAVARES, M. G.; E. H. RIBEIRO; L. A. O. CAMPOS; E. G. BARROS & M. T. V. A. OLIVEIRA. 2001. Inheritance patterns of RAPD markers in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Journal of Heredity** **92**(3): 279-282.
 142. TEMU, E. A.; R. H. HUNT; J. N. MINJAS & C. J. SHIFF. 1997. Detection of hybrids in natural populations of the *Anopheles gambiae* complex by the rDNA-based, PCR method. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** **91**(8): 963-965.
 143. THORPE, J. P. & A. M. SOLÉ-CAVA. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zool Scripta** **23**: 3-18.
 144. TORRES, E.; D. H. FOLEY & A. SAUL. 2000. Ribosomal DNA sequence markers differentiate two species of the *Anopheles maculatus* (Diptera: Culicidae) complex in the Philippines. **Journal of Medical Entomology** **37**(6): 933-937.
 145. VAN BORTEL, W.; H. D. TRUNG; P. ROELANTS; R. E. HARBACH; T. BACKELJAU & M. COOSEMANS. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex. **Insect Molecular Biology** **9**(3):335-340.
 146. VAN BORTEL, W.; T. SOCHANTA; R. E. HARBACH; S. SOCHEAT; P. ROELANTS; T. BACKELJAU & M. COOSEMANS. 2002. Presence of *Anopheles culifascies* B in Cambodia established by the PCR-RFLP assay developed for the identification of

- Anopheles minimus* species A and C and four related species. **Medical and Veterinary Entomology** **16**: 329-334.
147. VELOSO, P. H.; J. V. MOURA & R. M. KLEIN. 1956. Delimitação ecológica dos anofelíneos do subgênero *Kerteszia* na região costeira do sul do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **54**(3): 517-548.
 148. WALDSCHMIDT, A. M.; P. MARCO-JUNIOR; E. G. BARROS & L. A. O. CAMPOS. 2002. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology** **62** (4B): 923-928.
 149. WALTON, C.; J. M. HANDLEY; C. KUVANGKADILOK; F. H. COLLINS; R. E. HARBACH; V. BAIMAI & R. K. BUTLIN. 1999. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. **Medical and Veterinary Entomology** **13**:24-32.
 150. WALTON, C.; J. M. HANDLEY; F. H. COLLINS; V. BAINAI; R. E. HARBACH; V. DEESIN & R. K. BUTLIN. 2001. Genetic population structure and introgression in *Anopheles dirus* mosquitoes in South-east Asia. **Molecular Ecology** **10**: 569-580.
 151. WELSH, J. & M. McCLELLAND. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** **18**(24): 7213-7218.
 152. WESSON, D. M.; C. H. PORTER & F. H. COLLINS. 1992. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Molecular Phylogenetic and Evolution** **1**:253-269.
 153. WHITE, G. B. 1978. *Anopheles bwambiae* sp.n., a malaria vector in Semliki Valey, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (Diptera: Culicidae). **Systematic Entomology** **10**: 501-522.
 154. WHITE, G. B. 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **68**: 278-298.

155. WHITE, G. B. 1982. Malaria vector ecology and genetics. **British Medical Bulletin** **38**(2): 207-212.
156. WHITE, G. B. 1985. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. **Mosquito Systematic** **10**:13-44.
157. WILLIAMS, J. G. K.; A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI & K.J. LIVAK. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** **18**: 6531-6535.
158. WILLIAMS, J. G.; M. K. HANFEY; J. A. RAFALSKI & S. V. TINGEY. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology** **218**: 704-739.
159. WILKERSON, R. C. & E. L. PEYTON. 1991. The brazilian malaria vector *Anopheles (Kerteszia) cruzii*: life stages and biology (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics** **23**(2): 110-122.
160. WILKERSON, R. C.; T. J. PARSONS; D. G. ALBRIGHT; T. A. KLEIN & M. J. BRAUN. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). **Insect Molecular Biology** **1**(4): 205-211.
161. WILKERSON, R. C.; T. J. PARSONS; T. A. KLEIN; T. V. GAFFIGAN; E. BERGO & J. CONSOLIM. 1995a. Diagnosis by random amplified DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. **Journal of Medical Entomology** **32**(5): 697-704.
162. WILKERSON, R. C.; T. V. GAFFIGAN & J. B. LIMA. 1995b. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **90**(6): 731-732.

163. XU, J. N. & F. Y. QU. 1997. Ribossomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China. **Medical and Veterinary Entomology** **11**: 134-138.
164. YEH, F. C.; T. J. B. BOYLE; Y. Z. YE & J. M. XIYAN. 1999. **POPGENE version 1.32**. Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>. Último acesso: março de 2005.
165. ZAVORTINK, T. J. 1973. Mosquitoes studies (Diptera, Culicidae). XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. **Contributions of American Entomological Institute** **9** (3):1-59.

8. APÊNDICE I

Apêndice I. Sequência dos iniciadores utilizados na técnica PCR-RAPD.

	Iniciador	Sequência		Iniciador	Sequência
1.	A-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	31.	D-01*	5'-ACCGCGAAGG-3'
2.	A-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	32.	D-02	5'-GGACCCAACC-3'
3.	A-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	33.	D-03	5'-GTCGCCGTCA-3'
4.	A-04	5'-AATCGGGCTG-3'	34.	D-04	5'-TCTGGTGAGG-3'
5.	A-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	35.	D-05	5'-TGAGCGGACA-3'
6.	A-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	36.	D-06*	5'-ACCTGAACGG-3'
7.	A-07	5'-GAAACGGGTG-3'	37.	D-07	5'-TTGGCACGGG-3'
8.	A-08	5'-GTGACGTAGG-3'	38.	D-08*	5'-GTGTGCCCCA-3'
9.	A-09	5'-GGGTAACGCC-3'	39.	D-09*	5'-CTCTGGAGAC-3'
10.	A-10	5'-GTGATCGCAG-3'	40.	D-10*	5'-GGTCTACACC-3'
11.	A-11	5'-CAATCGCCGT-3'	41.	D-11*	5'-AGCGCCATTG-3'
12.	A-12	5'-TCGGCGATAG-3'	42.	D-12*	5'-CACCGTATCC-3'
13.	A-13	5'-CAGCACCCAC-3'	43.	D-13*	5'-GGGGTGACGA-3'
14.	A-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	44.	D-14*	5'-CTTCCCCAAG-3'
15.	A-15	5'-TTCCGAACCC-3'	45.	D-15*	5'-CATCCGTGCT-3'
16.	A-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	46.	D-16*	5'-AGGGCGTAAG-3'
17.	A-17	5'-GACCGCTTGT-3'	47.	D-17*	5'-TTTCCCACGG-3'
18.	A-18	5'-AGGTGACCGT-3'	48.	D-18	5'-GAGAGCCAAC-3'
19.	A-19	5'-CAAACGTCGG-3'	49.	D-19	5'-CTGGGGACTT-3'
20.	A-20	5'-GTTGCGATCC-3'	50.	D-20	5'-ACCCGGTCAC-3'
21.	B-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	51.	G-01*	5'-CTACGGAGGA-3'
22.	B-02	5'-TGATCCCTGG-3'	52.	G-02	5'-GGCACTGAGG-3'
23.	B-03*	5'-CATCCCCCTG-3'	53.	G-03	5'-GAGCCCTCCA-3'
24.	B-04*	5'-GGACTGGAGT-3'	54.	G-04	5'-AGCGTGTCTG-3'
25.	B-05	5'-TGCGCCCTTC-3'	55.	G-05	5'-CTGAGACGGA-3'
26.	B-06*	5'-TGCTCTGCCC-3'	56.	G-06*	5'-GTGCCTAACC-3'
27.	B-07*	5'-GGTGACGCAG-3'	57.	G-07*	5'-GAACCTGCGG-3'
28.	B-08	5'-GTCCACACGG-3'	58.	G-08	5'-TCACGTCCAC-3'
29.	B-09*	5'-TGGGGGACTC-3'	59.	G-09	5'-CTGACGTCAC-3'
30.	B-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	60.	G-10	5'-AGGGCCGTCT-3'

Apêndice I. continuação...

Iniciador		Sequência	Iniciador		Sequência
61.	B-11	5'-GTAGACCCGT-3'	92.	G-11	5'-TGCCCGTCGT-3'
62.	B-12	5'-CCTTGACGCA-3'	93.	G-12	5'-CAGCTCACGA-3'
63.	B-13	5'-TTCCCCCGCT-3'	94.	G-13	5'-CTCTCCGCCA-3'
64.	B-14*	5'-TCCGCTCTGG-3'	95.	G-14	5'-GGATGAGACC-3'
65.	B-15	5'-GGAGGGTGTT-3'	96.	G-15	5'-ACTGGGACTC-3'
66.	B-16	5'-TTTGCCCGGA-3'	97.	G-16	5'-AGCGTCCTCC-3'
67.	B-17	5'-AGGGAACGAG-3'	98.	G-17	5'-ACGACCGACA-3'
68.	B-18	5'-CCACAGCAGT-3'	99.	G-18	5'-GGCTCATGTG-3'
69.	B-19	5'-ACCCCCGAAG-3'	100.	G-19	5'-GTCAGGGCAA-3'
70.	B-20*	5'-GGACCCTTAC-3'	101.	G-20*	5'-TCTCCCTCAG-3'
71.	C-01*	5'-TTCGAGCCAG-3'	102.	X-01	5'-CTGGGCACGA-3'
72.	C-02	5'-GTGAGGCGTC-3'	103.	X-02	5'-TTCCGCCACC-3'
73.	C-05	5'-GATGACCGCC-3'	104.	X-03	5'-TGGCGCAGTG-3'
74.	C-06	5'-GAACGGACTC-3'	105.	X-04	5'-CCGCTACCGA-3'
75.	C-16*	5'-CACACTCCAG-3'	106.	X-05*	5'-CCTTTCCTC-3'
76.	C-19*	5'-GTTGCCAGCC-3'	107.	X-06	5'-ACGCCAGAGG-3'
77.	D-01	5'-ACCGCGAAGG-3'	108.	X-07	5'-GAGCGAGGCT-3'
78.	D-02	5'-ACCGCGAAGG-3'	109.	X-08	5'-CAGGGGTGGA-3'
79.	D-03	5'-GTCGCCGTCA-3'	110.	X-09	5'-GGTCTGGTTG-3'
80.	D-04	5'-TCTGGTGAGG-3'	111.	X-10*	5'-CCCTAGACTG-3'
81.	D-05	5'-TGAGCGGACA-3'	112.	X-11	5'-GGAGCCTCAG-3'
82.	D-06	5'-ACCTGAACGG-3'	113.	X-12	5'-TCGCCAGCCA-3'
83.	D-07	5'-TTGGCACGGG-3'	114.	X-13	5'-ACGGGAGCAA-3'
84.	D-08	5'-GTGTGCCCCA-3'	115.	X-14	5'-ACAGGTGCTG-3'
85.	D-09	5'-CTCTGGAGAC-3'	116.	X-15	5'-CAGACAAGCC-3'
86.	D-10	5'-GGTCTACACC-3'	117.	X-16	5'-CTCTGTTCGG-3'
87.	D-11	5'-AGCGCCATTG-3'	118.	X-17	5'-GACACGGACC-3'
88.	D-12	5'-CACCGTATCC-3'	119.	X-18	5'-GACTAGGTGG-3'
89.	D-13	5'-GGGGTGACGA-3'	120.	X-19	5'-TGGCAAGGCA-3'
90.	D-14	5'-CTTCCCCAAG-3'	121.	X-20	5'-CCCAGCTAGA-3'
91.	D-15	5'-CATCCGTGCT-3'	122.	H-16	5'-TCTCAGCTGG-3'

Apêndice I. Continuação...

Iniciador	Sequência	Iniciador	Sequência
123. D-16	5'-AGGGCGTAAG-3'	134. Y-01	5'-GTGGCATCTC-3'
124. D-17	5'-TTTCCCACGG-3'	135. Y-02	5'-CATCGCCGCA-3'
125. D-18	5'-GAGAGCCAAC-3'	136. Y-03	5'-ACAGCCTGCT-3'
126. D-20	5'-ACCCGGTCAC-3'	137. Y-04	5'-GGCTGCAATG-3'
127. Y-16	5'-GGGCCAATGT-3'	138. Y-05	5'-GGCTGCGACA-3'
128. Y-17	5'-GACGTGGTGA-3'	139. Y-07	5'-AGAGCCGTCA-3'
129. Y-18	5'-GTGGAGTCAG-3'	140. Y-10	5'-CAAACGTGGG-3'
130. Y-19	5'-TGAGGGTCCC-3'	141. Y-12*	5'-TCGCCAGCCA-3'
131. Y-20	5'-AGCCGTGGAA-3'	142. Y-13	5'-GGGTCTCGGT-3'
132. M-06	5'-CTGGGCAACT-3'	143. Y-15	5'-AGTCGCCCTT-3'
133. N-20	5'-GGTGCTCCGT-3'		

*iniciadores que não geraram produtos de amplificação